

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Nataša Ilić

Učinak različitih makrocikličkih spojeva na
proliferaciju stanica tumora *in vitro*

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2009.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Marijete Kralj, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvaljujem se dr. sc. Marijeti Kralj na pruženoj prilici da sudjelujem u zanimljivom projektu u ugodnoj radnoj atmosferi. Puno hvala na savjetima, podršci i strpljenju!

Zahvaljujem se dipl. ing. Marku Marjanovi u na odličnom objašnjavanju vezanom uz diplomski rad, spremnosti da pomogne u svakom trenutku i prijateljstvu!

Također zahvaljujem dragoj doc. dr. sc. Maji Matuli i prof. dr. sc. Nadi Oršoli na savjetima i pomoći!

Puno hvala mojoj cimi Branki na pomoći i svim prijateljima na divnom druženju!

Hvala mojim roditeljima na nevjerojatoj potpori i razumijevanju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINKOVI RAZLIČITIH MAKROCIKLIČKIH SPOJEVA NA PROLIFERACIJU STANICA TUMORA IN VITRO

Nataša Ilić

Zavod za molekularnu medicinu
Institut Ruđer Bošković, Bijenik 54, Zagreb

Makrociklički spojevi, posebno krunasti eteri, od izuzetne su važnosti u kemiji i biologiji, ponajviše zahvaljujući i mogućnosti selektivnog vezanja kationa. Krunasti spojevi imaju slična svojstva kao prirodni ionofori, no njihovo antitumorsko djelovanje tek se počinje istraživati. U ovom radu, istražili smo učinak 9 makrocikličkih spojeva na proliferaciju ljudskih tumorskih stanica HeLa, SW620, MCF-7, H460 i MiaPaCa-2 kao i mehanizam djelovanja najaktivnijih spojeva. Odredili smo proliferaciju stanica MTT testom, pri čemu su spojevi LET-610, LET-612, LET-646 i LET-613 pokazali značajno citostatičko i/ili citotoksično djelovanje. Za neke od testiranih spojeva prethodno je dokazana važnost veličine hidrofilne šupljine, tipa atoma donora i grupe koje prodiru u šupljinu na vezanje iona, te hidrofobnog prstena sa supstituentima za ugradnju u membranu. Ove strukturne karakteristike uspjeli smo povezati s njihovom antiproliferativnom aktivnošću u tumorskim stanicama. Kako bi rasvijetlili mehanizam djelovanja najaktivnijeg testiranog spoja LET-613 ($IC_{50} = 2 \mu M$), analizirali smo njegov utjecaj na stanični ciklus metodom protočne citometrije. LET-613 je doveo do zastoja stanica raka gušterače MiaPaCa-2 u G1 fazi staničnog ciklusa, smanjenja broja stanica u S fazi i kasnije do povećanja broja apoptotskih (subG1) stanica. *Annexin V* testom, koji specifično detektira i kvantificira apoptotske stanice dodatno smo potvrdili da spoj LET-613 i prethodno testirani LET-329 aktiviraju apoptozu u stanicama raka. Rezultati podupiru pretpostavku da krunasti spojevi narušavaju prijenos iona, što dovodi do poremećaja u staničnom ciklusu i aktivacije apoptoze u tumorskim stanicama.

(55 stranica, 18 slika, 2 tablice, 63 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: makrociklički spojevi, prijenos iona, stanični ciklus, apoptoza, rak

Voditelj: dr. sc. Marijeta Kralj, viši znanstveni suradnik

Suvoditelj: doc. dr. sc. Maja Matulić

Ocjenjivači: dr. sc. Marijeta Kralj
doc. dr. sc. Maja Matulić
prof. dr. sc. Nada Oršolić
prof. dr. sc. Marina Cindrić

Rad prihvaćen: 3. lipanj 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Diploma thesis

THE EFFECT OF DIFFERENT MACROCYCLIC COMPOUNDS ON TUMOR CELL PROLIFERATION IN VITRO

Nataša Ili

Division of Molecular Medicine
Ruđer Bošković Institute, Bijenika 54, Zagreb

Macrocyclic compounds, especially crown ethers are of great importance in chemistry and biology mostly due to their ability to selectively bind cations. Crown compounds possess ionophoretic properties, but their antitumor activity has been underexplored. In this diploma thesis we studied the effect of 9 macrocyclic compounds on proliferation of human tumor cells HeLa, SW620, MCF-7, H460 and MiaPaCa-2 and evaluated the mechanism of action of the most active compounds. We used MTT assay to assess the proliferation rate of tumor cells. Compounds LET-610, LET-612, LET-646 and LET-613 showed significant cytostatic and/or cytotoxic activity. For some compounds it was previously demonstrated that the size of hydrophilic cavity, type of donor atoms and groups that penetrate into the cavity affect ion binding, whence hydrophobic ring with substituents is important for membrane insertion. We showed that these structural characteristics correlate perfectly with the antiproliferative activity in tumor cells. In order to elucidate the mechanism of action of the most active tested compound LET-613 ($IC_{50} = 2 \mu M$), we used flow cytometry for the cell cycle analysis. LET-613 induced G1 arrest of human pancreatic cancer cell MiaPaCa-2, along with S phase reduction and subsequent increase in subG1 phase (apoptotic cells). Activation of apoptosis in human cancer cells treated with compounds LET-613 and previously tested LET-329 was confirmed by performing *Annexin V* test that specifically detects and quantifies apoptotic cells. The results support the hypothesis that crown compounds disrupt ion transport that leads to the cell cycle perturbations and activation of apoptosis in tumor cells.

(55 pages, 18 figures, 2 tables, 63 references, original in: Croatian)

Keywords: macrocyclic compounds, ion transport, cell cycle, apoptosis, cancer

Supervisor: Dr. Marijeta Kralj, Senior Research Associate

Cosupervisor: Dr. Maja Matuli

Reviewers: Dr. Marijeta Kralj
Doc. Dr. Maja Matuli
Prof. Dr. Nada Oršoli
Prof. Dr. Marina Cindri

Thesis accepted: June 3th 2009

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1	Makrocikli ki spojevi.....	2
1.1.2.	Krunasti eteri	3
1.2	Prijenos iona preko membrane	6
1.3	Makrocikli ki spojevi kao prijenosnici iona	7
1.4	Antitumorsko djelovanje makrocikli kih spojeva.....	8
1.5	Proliferacija i stani ni ciklus	9
1.6	Apoptoza	11
1.7	Uloga ionskog prijenosa u proliferaciji i apoptozi	14
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3.	MATERIJALI I METODE	17
3.1	Stani ne linije	17
3.1.1	Održavanje stani nih linija u kulturi	17
3.1.2	Brojanje stanica	18
3.2	Makrocikli ki spojevi.....	19
3.3	Ispitivanje antiproliferativnog u inka makrocikli kih spojeva <i>in vitro</i>	21
3.2.1	Test metil tiazolil tetrazolij (MTT)	21
3.3	Proto na citometrija	22
3.3.1	Priprema stanica za analizu stani nog ciklusa	23
3.3.2	Analiza stani nog ciklusa.....	24
3.3.3	Detekcija apoptoze metodom proto ne citometrije - <i>Annexin V</i> test	25
3.3.3.1	Priprema stanica za analizu apoptoze.....	26
3.3.3.2	Mjerenje apoptoze proto nom citometrijom	27
4.	REZULTATI.....	28
4.1	Utjecaj makrocikli kih spojeva na proliferaciju tumorskih stanica	28
4.2	Analiza utjecaja makrocikli kog spoja LET-613 na stani ni ciklus	33
4.3	Detekcija i kvantifikacija apoptoze	38
5.	RASPRAVA.....	41
6.	ZAKLJU AK	49
7.	LITERATURA.....	50

POPIS KRATICA

CDK – ciklin ovisna kinaza (engl. **cyclin-dependent kinase**)

Cdk – kataliti ka podjedinica CDK

CKI – inhibitori CDK (engl. **CDK inhibitors**)

DISC – od engl. **death-inducing signaling complex**

IAP – inhibitori apoptoti nih proteina

AIF – od engl. **apoptosis inducing factor**

DMEM – od engl. **Dulbecco's modified Eagle's medium**

DMSO – **dimetil sulfoksid**

PI – propidij-jodid (engl. **propidium iodide**)

PBS – fosfatni pufer (engl. **phosphate buffered saline**)

7-AAD – **7-aminoaktinomicin D**

BSA – gove i albumin iz seruma (engl. **bovine serum albumine**)

Ann BB – aneksin-vezuju i pufer (engl. **annexin-binding buffer**)

QSAR – od engl. **quantitative structure-activity relationship**

IC – od engl. **inhibitory concentration**

1. UVOD

Rak uglavnom nastaje iz jedne somatske stanice i njezinog potomstva. Stanice u nastaju em neoplasti nom klonu akumuliraju brojne geneti ke i epigeneti ke promjene, koje rezultiraju promjenom genske aktivnosti i potom promjenjenim fenotipom koji podliježe selekciji. Kona no, evoluiraju stanice s narušenom normalnom kontrolom proliferacije te postaju stanice raka. Osnovne fenotipske osobine zlo udnih tumorskih stanica su samodovoljnost signala rasta, neosjetljivost na signale inhibicije, izbjegavanje stani ne smrti (apoptoze), neograni eni replikativni potencijal, podržana angiogeneza, te invazivnost i metastaziranje (Ponder 2001).

Danas je rak odgovoran za 13 % smrtnih slu ajeva u svijetu i o ekuje se da e broj novih slu ajeva oboljelih od raka svake godine rasti od 10 milijuna 2000. godine na 15 milijuna 2020. godine (<http://www.who.int/en/>). Konvencionalne terapije koje se primjenjuju u lije enju oboljelih od raka uklju uju kirurško odstranjenje tumora, zra enje i kemoterapiju, a genska terapija se intenzivno istražuje. Me utim, esto ne rezultiraju željenim potpunim izlije enjem i lije enje raka standardnim pristupima je ograni eno zbog toksi nosti prema normalnom tkivu. Tradicionalnom citotoksi nom kemoterapijom, kojom se ošte uje stani na DNA, te tako inducira apoptoza, uz stanice raka ubija se i puno normalnih stanica. Naj eš e biva zahva eno tkivo s najve om vlastitom stopom proliferacije: koštana srž, folikuli kose i gastrointestinalni epitel. Pred nama stoji izazov da prona emo u inkovit i selektivan lijek. Razvoju protutumorskih lijekova može se pristupiti sintezom, te *in vitro* i/ili *in vivo* pretraživanjem (screeningom) spojeva, u potrazi za onim koji pokazuju antiproliferativnu aktivnost. Raznim testiranjima na stani nim linijama mogu e je preciznije istraživati mehanizme djelovanja, npr. utjecaj na stani ni ciklus, aktivaciju odre enog oblika smrti (apoptoza), aktivaciju ili inhibiciju gena i proteina. Citotoksi no djelovanje konvencionalnih kemoterapeutika možemo podijeliti u 4 faze: narušavanje stani ne homeostaze specifi nom me ureakcijom sa npr. DNA, mikrotubulima ili enzimom; prepoznavanje narušene homeostaze, koje u slu aju ošte enja DNA uklju uje protein p53; odluka o popravku ošte enja ili ulasku stanice u apoptozu; apoptoza (Bold i sur. 1997). Razvoj spojeva, koji e izazivati apoptozu djeluju i na druge stani ne mete vodit e nastanku lijekova ija je toksi nost razli ita od danas dostupnih kemoterapeutika i koje bi mogli pružati u inkovitu antitumorsku terapiju ili vrijednu dopunu postoje im terapijama.

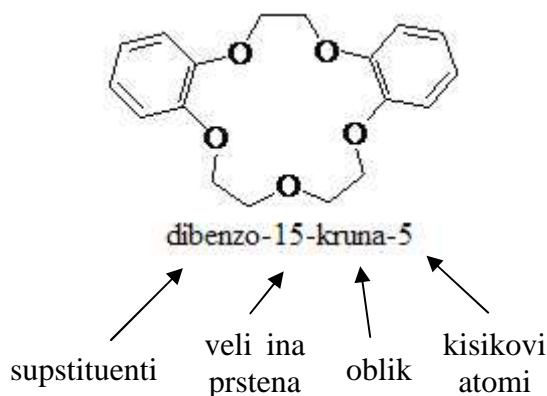
1.1 Makrocikli i spojevi

Makrocikli kao i supramolekularna kemija – grana kemije koja se bavi nastajanjem složenih multimolekularnih vrsta iz relativno jednostavnih molekularnih komponenata, razvila se u aktivno i obilno područje u kemiji, smješteno na granici kemije, biologije i fizike. Makrocikli i spojevi imaju prstenastu strukturu i sadrže zatvoreni lanac od 12 ili više heteroatoma. Obično su 3 ili više atoma donora mogu koordinirati metalni ion. Makrocikli obuhvaćaju razne skupine spojeva, između ostalih krunaste etere, kriptande, lariatne etere, kaliksarene, ciklodekstrine, sferande. Pedersen, Lehn i Cram dobili su Nobelovu nagradu 1987. za razvoj i primjenu molekula koje su sposobne stvarati interakcije specifične za strukturu i s visokom selektivnošću. Temeljeno na tom radu, područje makromolekularne kemije uzima u obzir osnovne aspekte molekularnog prepoznavanja i samoorganizacije, te koristi te biološke principe za stvaranje pametnih umjetnih sistema. Stoga, postoji ogroman potencijal za buduće primjene u područjima bio- i nanotehnologije, zaštite okoliša, katalize, molekularne elektronike i fotonike, kao i medicine.

Otkriće krunastih etera 1967., prvih neutralnih sintetskih spojeva sa značajnom sposobnošću nekovalentnog vezanja kationa, vodilo je do sintezi i istraživanju brojnih makrocikličkih spojeva (do sad ih je sintetizirano oko 10000) i njihovoj primjeni u mnogim područjima. Napredovala su područja organske i anorganske sinteze, biokemije, fazno-prijenosne katalize, biološkog transporta iona, strukturne analize i drugih mladih disciplina. Jedno od bitnih obilježja tada novog polja makrocikličke kemije, bila je visoka selektivnost koje su sintetski i prirodni makrocikli – domaćini imali za razne goste – anione, katione i neutralne vrste. Kako su se principi koji određuju ovu selektivnost otkrivali, postao je moguć pametni dizajn domaćina koji imaju unaprijed određenu selektivnost za specifične goste. To je dovelo i do korištenja makrocikla u ekstrakciji otapalom, tekućim membranama, kapilarnoj elektroforezi, kromatografiji i drugim sustavima za odvajanje (Gloe 2005).

1.1.2. Krunasti eteri

Krunasti eteri ili krune su makrocikli koji polieteri s različitim brojem ponavljanja ih etilen-oksidskih jedinica ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), dok su kod krunastih spojeva atomi kisika zamijenjeni npr. dušikom ili sumporom (npr. aza-krunasti spojevi s atomima dušika).

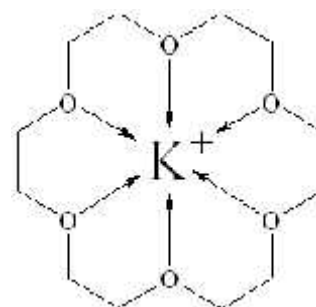


Slika 1. Primjer krunastog etera.

Nazivi krunastih etera prema nomenklaturnim pravilima IUPAC-a su složeni i zato se ti spojevi imenuju prema dodanim supstituentima, broju atoma u prstenu (veličini prstena), obliku prstena i broju kisikovih atoma u njemu (Slika 1). Imaju oblik krune, a neobičajna jaka nekovalentna interakcija s ionom je takva kao da domaćin okružuje kation (Kralj i sur. 2008).

Sastoje se od hidrofobnog prstena etilenskih grupa koji okružuje hidrofilnu šupljinu sastavljenu od kisikovih atoma, a takva im struktura omogućuje istodobnu ugradnju u membranski lipidni dvosloj, te stvaranje stabilnih kompleksa s metalnim ionima (Marjanović i sur. 2007). Šupljina krunastih etera bogata je elektronima, zbog slobodnih elektronskih parova koji potječu od atoma donora - kisika ili drugih atoma koji ih zamjenjuju (npr. dušik, sumpor ili fosfor), što utječe na karakteristike vezanja.

Npr. 18-kruna-6 ima 6 donora kisika u vezujućoj konformaciji, tj. okrenutih prema unutrašnjosti šupljine (Slika 2). U vrstom stanju, u odsutnosti kationa zauzima tipični oblik paralelograma, no prilikom vezanja kationa (npr. kalija) vjerojatno dolazi do konformacijske reorganizacije i nastaje simetričan kompleks s ionom kalija u centru (Gokel i sur. 2004).



Slika 2. 18-kruna-6 koordinira ion kalija.

Velicina polieterske šupljine je proporcionalna veličini prstena i stoga su mali krunasti eteri s planarnom konformacijom i ograničenom gibljivošću (do 18 atoma u prstenu), selektivni u stvaranju kompleksa ovisno o veličini hidrofilne šupljine i veličini vezanog iona,

te se taj koncept naziva „odnos šupljina-velikost“ (Kralj i sur. 2008). Tako npr. 18-kruna-6 ima veliki afinitet za kalijeve, a 15-kruna-5 za natrijeve ione (Gokel i sur. 2004). Velika stabilnost kompleksa je obično povezana s velikim ulaskom kationa u polietersku šupljinu. Međutim, veliki promjer iona, dobro otapanje u otapalu ili steričke smetnje mogu spriječiti značajnije prodiranje u hidrofilnu šupljinu, što vodi do stvaranja labavog kompleksa. S druge strane, veliki krunasti eteri (24 i 30 atoma u prstenu) imaju veliku konformacijsku pokretljivost, što im omogućuje stvaranje različitih koordinacijskih okruženja u kompleksima s kationima, pa sama veličina polieterske šupljine nema ključnu ulogu. Nadalje, budući da se stvaranje kompleksa kruna-ion temelji na slabim nekovalentnim interakcijama, karakteristike vezanja snažno ovise o gustoći i naboju kationa, prirodi otapala i nukleofilnosti iona sa suprotnim nabojem (Kralj i sur. 2008). Vezanje je obično jače u otapalima niže polarности, odnosno vezanje i otpuštanje kationa je brzo u polarnim otapalima (Gokel i sur. 2004).

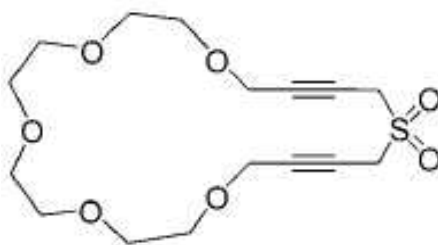
Sinteza makrocikličkih spojeva koji mogu razlikovati različite kemijske vrste od izuzetne je važnosti u supramolekularnoj kemiji (kemija doma in-gost) (Schneider i Yatsimirsky 2008). Kao što je ranije napomenuto, vrsta i smještaj atoma donora imaju važnu ulogu u selektivnosti krunastog etera. Tako npr. aza krunasti spojevi s atomima dušika umjesto kisika, zadržavaju sličnu veličinu i oblik makrocikličkog prstena iako mogu imati različite konformacije, međutim njihova kiselobazna svojstva se znatno razlikuju. Miješani makrociklički spojevi s druge strane, s kisikom i dušikom kao donorima mogu vezati više vrsta kationa i aniona nego spojevi s isključivo atomima kisika ili dušika u makrocikličkom prstenu, budući da prirodno ti atomi imaju različitu selektivnost vezanja. Smještaj supstituenata, odnosno broj lanaca koji sadrže atome donora također može utjecati na selektivnost, jer makrociklički prsten i broj lanaca mogu zajedno kooperativno vezati ion.

Dakle, ogromnu strukturnu raznolikost krunastih etera i selektivnost vezanja moguće je ostvariti mijenjanjem veličine makrocikličke šupljine, promjenama oblika i topologije, broja i vrste supstituenata (npr. benzen, cikloheksan) i prilagodbom broja, vrste i položaja donora (Kralj i sur. 2007). Masena spektrometrija široko se koristi za detekciju nastalog pozitivno nabijenog molekularnog iona, odnosno kompleksa kation-krunasti eter, kao i za istraživanje selektivnosti (Gokel i sur. 2004).

Krunasti eteri posjeduju mnoge značajne odlike, ali njihovo najvažnije svojstvo je sposobnost vezanja anorganskih i organskih kationa, s time da najveći afinitet posjeduju za alkalijske i zemnoalkalijske katione. Ubrzo nakon otkrića te mogućnosti stvaranja raznih kompleksa, pojele su strukturne modifikacije krunastih spojeva kako bi se kontrolirala veličina kojom vežu ion i selektivnost. Osim tradicionalno u kemiji (npr. kao senzori za širok spektar

anorganskih iona), primjenu nalaze i u biologiji zbog mogu nosti reguliranja enzimatske aktivnosti, interakcije, alkilacije i cijepanja DNA, te djelovanja kao antimikrobni agensi. Njihova svojstva - selektivnost pri vezanju iona i ugradnja u membranu, zajedno s relativnom lako om sinteze i strukturnih modifikacija, ine ih privla nim modelima prirodnih prijenosnika iona (kao što su gramicidin, valinomycin i nonaktin), pa se koriste za izu avanje ionskog membranskog prijenosa, posebice natrijevih i kalijevih iona (Gokel i sur. 2007).

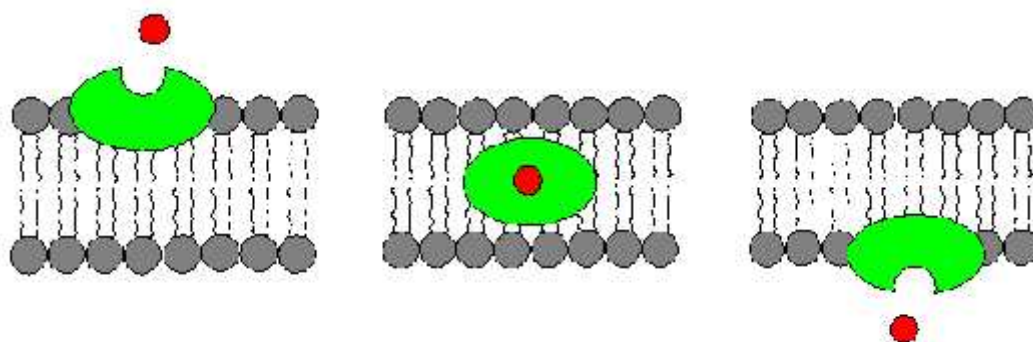
Osim toga, sintetizirani su i funkcionalizirani krunasti eteri kako bi se pove ala mogu nost njihove primjene u biomedicini. Na primjer, sinteza funkcionaliziranih kruna, koje mogu stupiti u interakciju s DNA vodila je k ispitavanju njihove sposobnosti usporavanja rasta tumorskih stanica u kulturi (Gokel i sur. 2007). Neki od njih, npr. kompleksi krunastih etera sa bis(propargil)sulfonom u kojem je bis(propargil)sulfon odgovoran za cijepanje DNA, a krunasti eter za vezanje iona, pokazali su dobro antitumorsko djelovanje (McPhee i Kerwin 2001) (Slika 3). Brojni su pokušaji pripravljanja potencijalnih antitumorskih ili biološki aktivnih spojeva, u kojima su krunasti eteri dijelovi molekule koji omogu avaju ili poboljšavaju djelovanje svojstveno drugom dijelu molekule kao u navedenom primjeru, me utim sustavno ispitivanje potencijalne antitumorske aktivnosti nefunkcionaliziranih krunastih spojeva tek se po elo provoditi (Kralj i sur. 2008).



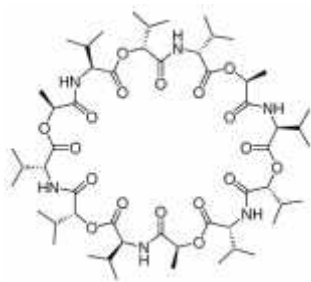
Slika 3. Bis(propargil)sulfon krunasti eter.

1.2 Prijenos iona preko membrane

Dva su osnovna sustava za selektivni prijenos metalnih iona niz elektrokemijski gradijent preko stani ne membrane: ionski nosa i (ionofori) (Slika 4) i ionski kanali. Ionofori su male hidrofobne molekule topive u lipidnom dvosloju, sa strateški raspore enim kisikovim atomima, koje pove avaju permeabilnost membrane za specifi ne anorganske ione (Alberts i sur. 2002), a ionski kanali i pore su integralni membranski proteini koji reguliraju brzo i selektivno kretanje iona kroz membranu.



Slika 4. Shematski prikaz prijenosa iona niz elektrokemijski gradijent preko stani ne membrane. Ionski nosa veže ion na onoj strani stani ne mebrane gdje je koncentracija iona viša, difundira kroz fosfolipidni dvosloj i otpušta ga na suprotnu stranu, gdje je koncentracija niža.



Slika 5. Struktura valinomicina

Valinomicin (Slika 5) je vjerojatno najpoznatiji prirodni ionofor koji selektivno prenosi kalijeve ione (Pressman 1976). Taj vrlo fleksibilan makrociklički peptidni spoj od 36 atoma u prstenu ne veže kalij u unutrašnjoj šupljini, već se savija i potpuno obuhvaća ion kalija (Gokel i sur. 2004).

1.3 Makrocikli ki spojevi kao prijenosnici iona

Ionofori, kao i otvoreni, neregulirani ionski kanali uzrokuju brz gubitak stanih ionskih gradijenata, te tako dovode do osmotskog i fiziološkog stresa organizma (Gokel i sur. 2004). Stoga, prijenosnici iona imaju antibiotska svojstva, a ionofore uglavnom prirodno proizvode mikroorganizmi za napad na druge mikrobe (npr. gramicidin, valinomycin) (Alberts i sur. 2002). Budući da se krunasti eteri ponašaju vrlo slično prirodnim ionoforima, nije iznenađujuće da toksikološki djeluju na prokariotske i eukariotske stanice, što je vodilo do daljnjih istraživanja u smjeru razvoja kruna kao farmakoloških tvari (Tso i sur. 1981). Prije više od 20 godina, istraživanja su pokazala da većina ispitanih kationskih ionofora (npr. valinomycin), uključujući i krunaste spojeve (npr. dibenzo-18-kruna-6, heksaciklen trisulfat), izaziva uglavnom neurobihevioralne učinke u štakorima, zečevima i miševima (Gad i sur. 1985). Važno je napomenuti da su se simptomi potpuno povukli nakon prekida tretmana, što upućuje na to da su primjećeni učinci povratne farmakološke prirode. Iako su citotoksični, pokazano je da krunasti eteri nisu genotoksični u bakterijama (Arenaz i sur. 1989) i stanicama sisavaca (Arenaz i sur. 1992), što potvrđuje da je njihovo toksično djelovanje vezano uz interakciju s membranom, a ne s DNA. Nadalje, Boojar i Goodarzi otkrili su da 18-kruna-6 i 15-kruna-5, osim što smanjuju vijabilnost stanica, također povećavaju oksidativna oštećenja u normalnim ljudskim stanicama fibroblasta WI38 i štakorskim stanicama pluća (Boojar i Goodarzi 2006a; Boojar i Goodarzi 2006b). Usto, oba spoja su potaknula stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i povećala aktivnost antioksidativnih enzima – superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze.

Krunasti eteri se zbog svojih svojstava također koriste u sintezi ionskih kanala (Gokel i sur. 2004), kao što su na primjer hidrafili. Oni oponašaju strukturu proteinskih kanala, tako da sadrže dva udaljena krunasta etera koji čine ulazno i izlazno mjesto pore. Oba krunasta etera su vezana za hidrofobni lanac koji ih dijeli od središnjeg krunastog etera, a mogu imati i bočne lance. Središnja jedinica je specifično dizajnirana kako bi stabilizirala kation tijekom prijelaza kroz membranu. Udaljeni makrocikli ki prsteni se pritom nalaze na suprotnim krajevima membrane, hidrofobni lanac se smješta uz lance masnih kiselina i bočni lanci u vrhu udaljene krunaste etere u membrani i vrlo su važni za stvaranje aktivnih prijenosnika iona. Mogu transportirati ione u oba smjera, narušavaju i osmotsku ravnotežu i uzrokuju i smrt organizma. Leevy i suradnici (2005a) su ustanovili da su hidrafili citotoksični u bakterijama i stanicama sisavaca, te da pokazuju antitumorsko djelovanje *in vitro*.

1.4 Antitumorsko djelovanje makrocikličkih spojeva

Prije više od 20 godina ustanovljeno je da valinomycin ima antitumorsko djelovanje *in vivo* (Kleuser i sur. 1985). Glavna prepreka u korištenju ionofora kao antitumorskih tvari je njihova toksičnost u kritičnim organskim sustavima kao što je npr. živani sustav. No, pokazalo se da se velika toksičnost može značajno smanjiti ugradnjom valinomicina u liposome, dok se istovremeno zadrži ili povećava antitumorska aktivnost (Daoud i Juliano 1986). Ipak, postoji malo istraživanja o antiproliferativnoj aktivnosti nefunkcionaliziranih krunastih etera u stanicama sisavaca (Kralj i sur. 2008). Jedno od njih je pokazalo da diacetil-dibenzo-18-kruna-6 inhibira rast tumora *in vivo*, vjerojatno blokirajući Ca^{2+} kanale tumorskih stanica (Mirkhodjaev i sur. 2005). Nasuprot tome, divaleril-18-kruna-6 djeluje i kao Ca^{2+} ionofor, potiče rast sarkoma u štakorima. Prvo sustavno istraživanje utjecaja krunastih etera na rast i smrt stanica tumora *in vitro* proveli su Marjanović i suradnici (2007). Autori su dokazali antiproliferativni učinak 14 analoga kruna i aza-kruna koji snažno korelira istovremeno s tipom hidrofilne šupljine (veličinom i vrstom hetero-atoma) i karakteristikama hidrofobnog prstena pri čemu je di-*tert*-butildicikloheksano-18-kruna-6 pokazivala izrazito snažan učinak (u submikromolarnim koncentracijama). Također je pokazano da spojevi izazivaju zaustavljanje u G1 fazi ciklusa i apoptozu, slično kao i valinomycin (Marjanović i sur. 2007).

1.5 Proliferacija i stani ni ciklus

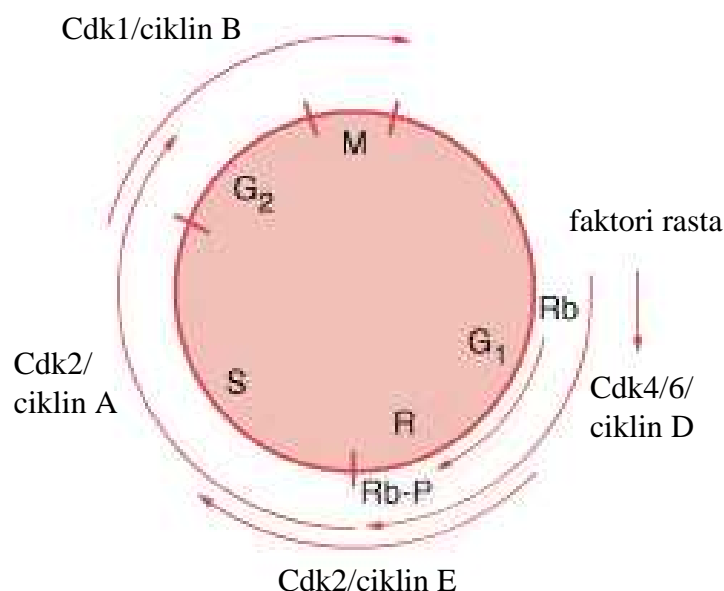
Promjene u regulaciji stani ne proliferacije i potisnuta apoptoza potrebne su da bi moglo do i do razvoja neoplazije (Green 1998). Naše stanice imaju vlastiti proliferativni potencijal, potreban za normalni rast i razvoj organizma, me utim stani ne diobe moraju biti precizno regulirane s obzirom na vrijeme i mjesto (Kufe i sur. 2002). Mutacije u protoonkogenima i inaktivacija tumor supresor gena mogu narušiti regulaciju stani nog ciklusa i aktivirati tumorski rast. Dva najbitnija procesa tijekom stani nog ciklusa su sinteza DNA i mitoza. U G1 fazi se sintetiziraju potrebne stani ne komponente za S fazu, a u G2 fazi za M fazu.

Stani ni ciklus je reguliran unutrašnjim kontrolnim to kama i vanjskim regulatorima. Unutarnje kontrolne to ke su uklju une u provjeru replikacije DNA (u G2 fazi), provjeru pravilne raspodjele kromosoma u metafaznoj plo i (mitotska kontrolna to ka) i provjeru ošte enja DNA (u G1 i G2 fazi), te tako kontroliraju prijelaze izme u S, G2 i M faza. Vanjski regulatorni put se javlja kao odgovor na okolišne uvjete (npr. faktore rasta, hormone) i može koristiti iste kontrolne to ke kao i unutarnji put. Glavnu ulogu u prolasku stanice kroz kontrolne to ke ima aktivacija visoko konzerviranih enzima – ciklin ovisnih kinaza (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDK) (Slika 6), te je stoga izvanredno regulirana na nekoliko razina. Aktivni CDK holoenzim se sastoji od kataliti ke (Cdk) i regulatorne (ciklin) podjedinice. Na ini regulacije CDK aktivnosti su: (1) svaki protein ciklin se sintetizira u odre enom dijelu stani nog ciklusa ili kao odgovor na odre ene faktore rasta; (2) svaki ciklin se razgra uje u odre enom dijelu stani nog ciklusa proteolizom posredovanom ubikvitinom; (3) ciklinska podjedinica se mora vezati s kataliti kom podjedinicom kako bi CDK bio aktivan; (4) nastali kompleks se mora fosforilirati kako bi dosegao najve u specifi nu aktivnost pomo u regulatorne kinaze CAK (engl. *CDK-activating kinase*); (5) kompleks se inaktivira fosforilacijom na specifi nim položajima u ATP veznom mjestu enzima npr. pomo u Wee kinaze i može se ponovo aktivirati defosforilacijom tih položaja pomo u fosfataze Cdc25; (6) inhibitori CDK (engl. *CDK inhibitors*, CKI) mogu inhibirati stvaranje kompleksa ciklin/CDK ili aktivaciju ve stvorenog kompleksa, a njihova sinteza, razgradnja i aktivnost je regulirana mitogenim i antimitogenim signalima (npr. ošte enje DNA) (Kufe i sur. 2002). Posljednji na in regulacije CDK uklju uje programiranu razgradnju CDK i ostalih regulatora stani nog ciklusa pomo u ubikvitina (Koepp i sur. 1999).

Prijelaz miruju ih stanica iz G0/G1 u S fazu regulirana je s dvije glavne kontrolne to ke; to su kompetencijska (nalazi se oko 12 sati prije po etka S faze) i restriksijska to ka (2 sata). Više faktora rasta je potrebno stanici za prijelaz kroz ove dvije kontrolne to ke i oni

stimuliraju sintezu ciklina D (Sher 1993). S druge strane, npr. transformiraju i faktor rasta (engl. *transforming growth factor*- , TGF-) djeluje kao tumor supresor - inhibira rast stanica potičući i ekspresiju CKI (Wakefield i Roberts, 2002). Kad je stanica prošla kroz restriksijsku točku, završava stanični ciklus bez potrebe za dodatnim faktorima rasta. Međutim, kako bi se stanica nastavila dijeliti, mora proći kroz dvije kontrolne točke u svakoj slijedećoj G1 fazi, što zahtijeva stalnu prisutnost faktora rasta. Dakle, prijelaz stanica iz mirovanja u diobu i obrnuto ovisi o izvanstaničnim uvjetima i drugačije je reguliran u normalnim i tumorskim stanicama (Kufe i sur. 2002).

Jedan važan supstrat kompleksa Cdk4/6/ciklin D potrebnog za prijelaz preko restriksijske točke je tumor supresorski protein **retinoblastom (Rb)**. On je konstitutivno eksprimiran i onemogućava stanicama prolaz kroz G1 fazu staničnog ciklusa kad je u kompleksu s E2F transkripcijskim faktorima (Goodrich i sur. 1991). Međutim, kad ga CDK kompleks fosforilira (Matsushime i sur. 1992), Rb ne može više vezati E2F (Nevins i sur. 1997) i kreće se transkripcija gena čiji su produkti potrebni u S fazi (Wu i sur. 1995), te ekspresija ciklina E u kasnoj G1 fazi (Geng i sur. 1996). Nastaje novi CDK kompleks Cdk2/ciklin E, koji je potreban za početak S faze staničnog ciklusa (Ohtsuboi sur. 1995).



Slika 6. Regulacija staničnog ciklusa. Za prolaz stanice kroz kontrolne točke potrebna je aktivacija odgovarajućih ciklin ovisnih kinaza (CDK). Faktori rasta potiču ekspresiju ciklina D. Kompleks Cdk4/6/ciklin D fosforilira Rb protein ($Rb \rightarrow Rb-P$), koji potiče ekspresiju ciklina E, te nastaje kompleks Cdk2/ciklin E. Rb označava restriksijsku točku (Kufe i sur. 2002).

Ukoliko pak stanica pretrpi neki stres, npr. oštećenje DNA, onkogenu promjenu, manjak faktora rasta, povećanje količine transkripcijskog faktora p53 i on može ili zaustaviti prijelaz iz G1 u S fazu i time omogućiti popravak pogreške ili potaknuti apoptozu. Protein p53 se u normalnim stanicama brzo razgrađuje, tako da ga veže i obilježi protein Mdm2 za proteolizu ubiquitinskim putem. Međutim određeni signali vode do postranslacijskih modifikacija p53, čime se inhibira vezanje za Mdm2 i povećava se afinitet p53 za DNA vezna mjesta (Sakaguchi i sur. 1998). Međudjelovanje p53 ili Mdm2 s drugim proteinima također onemogućava vezanje Mdm2 na p53, te njegovu razgradnju (Kufe i sur. 2002; Ryan i sur. 2001). Stabilizirani i aktivirani protein p53 potiče transkripciju brojnih gena, uključujući u zaustavljanje ciklusa, indukciju popravka ili pokretanje apoptoze. Povećava ekspresiju CKI proteina p21, koji inhibira aktivnost CDK kompleksa (Cdk4/6/ciklin D i Cdk2/ciklin E) potrebnih za prijelaz stanice iz G1 u S fazu stani nog ciklusa (Kufe i sur. 2002). Usto, protein p21 može izravno inhibirati replikaciju DNA vezanjem na protein koji se nalazi u jezgri stanica u proliferaciji (engl. *proliferating cell nuclear antigen*, PCNA), podjedinicu DNA polimeraze (Nakanishi i sur. 1995). Skraćivanje telomerne DNA tijekom starenja stanica također aktivira p53 koji zaustavlja stani ni ciklus (Kufe i sur. 2002). Važnost normalne aktivnosti gena p53 vidljiva je i iz činjenice da preko 50% tumora ljudi posjeduje neku mutaciju u tom tumor supresorskom genu.

1.6 Apoptoza

Apoptoza ili programirana stani na smrt nužna je za regulaciju broja stanica u populaciji, što je važno u normalnom razvoju organizma i održavanju tkivne homeostaze. Poremećena apoptoza rezultira raznim bolestima, te stoga ovaj proces zahtijeva strogu regulaciju. Produljeno stani no preživljenje može pridonijeti nastanku genetske nestabilnosti i nakupljanju mutacija, te razvoju tumora, a rak upravo karakterizira neravnoteža stani ne proliferacije i apoptoze (Kufe i sur. 2002). Većina kemoterapeutika ostvaruje svoje djelovanje izazivanjem apoptoze i čini se da je razvoj otpornosti na kemoterapiju posredovan promjenom osjetljivosti na proces apoptoze (Bold i sur. 1997).

Apoptoza se pokreće zbog nedostatka pozitivnih signala (npr. faktora rasta) ili primanja negativnih signala (npr. oštećenje DNA, aktivacija receptora smrti, poremećaj stani nog ciklusa, manjak faktora rasta). Postoje dva dobro opisana apoptotična puta: vanjski i unutarnji, te u oba središnju ulogu imaju cisteinske proteaze kaspaze (Slika 7), koje cijepanjem

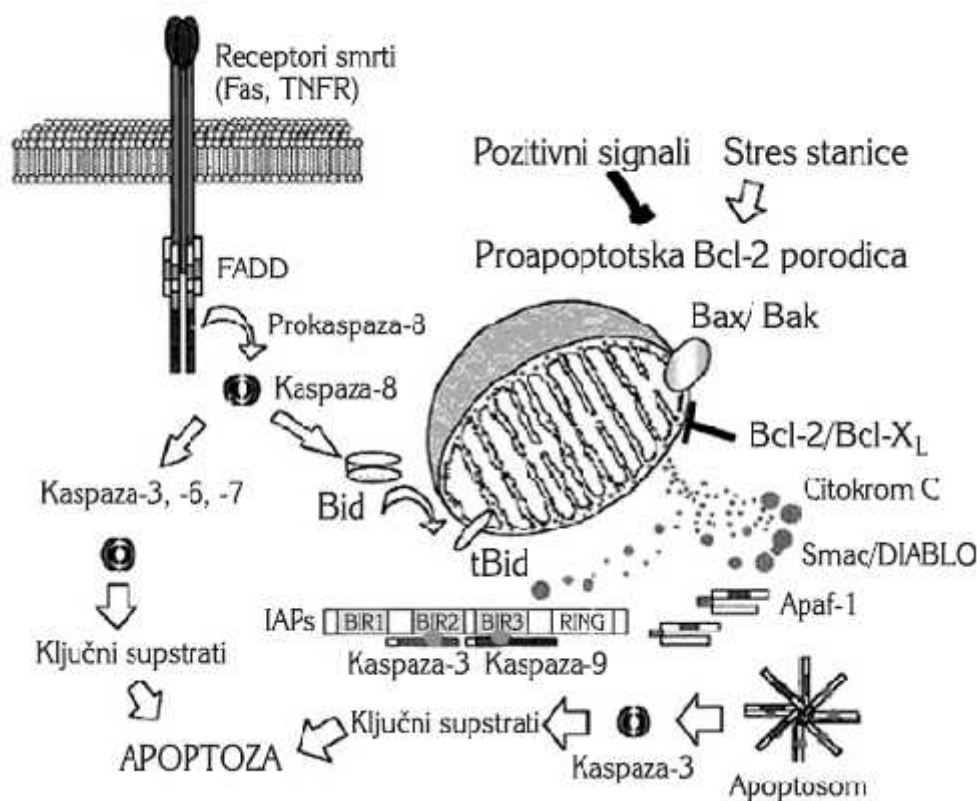
specifi nih supstrata dovode do tipičnih biokemijskih i morfoloških promjena, kao što su: izlaganje fosfatidil-serina na vanjskoj strani stanične membrane, kondenzacija kromatina i fragmentacija DNA. Na kraju nastaju apoptotska tjelešca (fragmenti stanice), koja pupaju sa stanične membrane i fagocitiraju se. Vanjski put uključuje direktno djelovanje enzima ili je posredovan receptorima smrti pri čemu dolazi do stvaranja DISC-a (engl. *death-inducing signaling complex*) (Imai i sur. 1999), a unutarnji je kemijski induciran i obično vodi do mitohondrijskog oštećenja što rezultira otpuštanjem proteina citokroma *c*, smještenog u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani. Citokrom *c* se udružuje s aktiviranim imbenikom apoptotičnih proteaza 1 (engl. *apoptotic peptidase activating factor 1*, Apaf-1), kaspazom-9 i dATP-om, te zajedno tvore multiproteinski kompleks apoptosom (Li i sur. 1997). DISC aktivira prokaspazu-8, a apoptosom aktivira prokaspazu-9. Aktivirane inicijatorske kaspaze-8 i -9 dalje procesiraju efektorske kaspaze-3, -6, i -7, koje su odgovorne za većinu procesa cijepanja tijekom apoptoze (Boatright i Salvesen 2003).

Proteini koji su do sada inhibirali apoptozu se funkcionalno inaktiviraju i sada potiču apoptozu (Kufe i sur. 2002). Kaspaza-3 djeluje na više staničnih enzima i strukturalnih proteina jezgre i citoskeleta. U zdravim stanicama kaspaze se nalaze u citoplazmi u inaktivnom obliku (zimogeni) i aktivnost glavnog enzima odgovornog za razgradnju DNA (engl. *DNA fragmentation factor/caspase-activated deoxyribonuclease*, DFF/CAD) je suprimirana njegovim inhibitorom, kojeg cijepa kaspaza-3, kako bi se spriječila neželjeno kretanje u staničnu smrt (Enari i sur. 1998). Usto, funkcija kaspaza se čak i nakon aktivacije cijepanjem može inhibirati fiziološkim inhibitorima kaspaza npr. proteinima iz porodice inhibitora apoptotičnih proteina, IAP i na taj način se sprječava neželjena ili slučajna proteoliza (Kufe i sur. 2002). Proteini vezani uz apoptozu – AIF (engl. *apoptosis inducing factor*), citokrom *c* i Smac/DIABLO su smješteni u mitohondriju i otpuštaju se samo nakon signala za apoptozu (Karki i sur. 2007).

Bcl-2 porodica proteina uključuje antiapoptotične i proapoptotične imbenike, te njihov omjer određuje osjetljivost stanice na apoptozu. Mnogi članovi mogu međusobno stvarati homodimere i heterodimere proteina što ovisi o interakciji između njihovih domena (Kufe i sur. 2002). Nakon kemijske indukcije (npr. nedostatak faktora rasta), promjena proteina porodice Bcl-2 na mitohondrijskoj membrani dovodi do stvaranja većih ionskih kanala kroz koje izlaze apoptotski faktori, kao što su citokrom *c* i AIF, te se nastavlja unutarnji put aktivacije apoptoze (Susin i sur. 1996). U ranoj fazi apoptoze na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani dolazi i do slabljenja transmembranskog potencijala (Inai i sur. 1997). Iz mitohondrija se otpušta i Smac/DIABLO, koji vjerojatno neutralizira IAP članove (Adrain i

sur. 2001). S druge strane, ispuštanje citokroma *c*, zbog narušenog prijenosa elektrona može izazvati neapoptotsku staničnu smrt (Kufe i sur. 2002). Proapoptotički protein Bid povezuje vanjski i unutarnji put aktivacije apoptoze. Kad ga aktivirana kaspaza-8 cijepa putuje iz citosola u mitohondrij i utječe na proteine Bcl-2 porodice potičući otpuštanje citokroma *c* (Green 1998; Adrain i sur. 2001).

Ako su oštećenja DNA prevelika, onkogen p53 može pokrenuti apoptozu aktivacijom niza gena koji sudjeluju u poticanju apoptoze (npr. receptora smrti i gena iz Bcl-2 porodice (Kufe i sur. 2002) i vjerojatno također drugim mehanizmom neovisnim o transkripcijskoj regulaciji (Meulmeester i Jochemsen 2008).



Slika 7. Signalni putevi apoptoze. Preuzeto iz Zimmermann i Green 2001.

1.7 Uloga ionskog prijenosa u proliferaciji i apoptozi

Membranski ionski kanali važni su za održavanje homeostaze putem reguliranja unutarstanične koncentracije iona, osobito K^+ , Cl^- i Ca^{2+} , citosolnog pH i staničnog volumena. Stoga su neophodni za staničnu proliferaciju, imaju ulogu u razvoju tumora, te su nekad ključni regulatori apoptoze. Međutim, postoje kontradiktorni dokazi o tome kakva je uloga prijenosa iona u apoptozi i inhibiciji tumorskog rasta (Kunzelmann 2005). S jedne strane, poznato je da je aktivacija K^+ kanala nužna za proliferaciju, prvenstveno za napredovanje kroz G1 fazu staničnog ciklusa (Wonderlin i Strobl, 1996). Brzo proliferirajuće stanice, kao što su tumorske stanice su vrlo depolarizirane (Kunzelmann 2005). Također, istraživanja pokazuju da blokatori kalijevih kanala inhibiraju proliferaciju, zaustavljaju i stanice u G1 fazi staničnog ciklusa, te dolazi do aktivacije ili čak inhibicije apoptoze (Wonderlin i Strobl, 1996). S druge strane, istovremeno se smatra da promjene u ionskoj jakosti zbog izlaska K^+ i Cl^- iona, te ulaska Ca^{2+} iona, potiču procese apoptoze. Kalij je najzastupljeniji ion u stanicama (140 mM) i većina istraživanja potvrđuje mišljenje da izlaženje K^+ iona dovodi do smanjivanja staničnog volumena i potiče apoptozu, tako da remeti mitohondrijski ili potencijal plazmatske membrane, rani događaj u apoptozi (Kunzelmann 2005). Mitohondrijski membranski potencijal, pokretačka snaga sinteze ATP-a, smanjuje se tijekom apoptoze, dok održavanje mitohondrijskog potencijala sprječava apoptozu induciranu različitim signalima (Inai i sur. 1997).

Ovakva neslaganja vjerojatno su posljedica činjenice što se većina istraživanja bavi aktivnošću u ili ekspresijom kalijevih kanala, jednim od najrasprostranjenijih i najraznolikijih porodica ionskih kanala plazmatske membrane, koji imaju mnoštvo bitnih uloga u različitim tipovima stanica (Wonderlin i Strobl, 1996). Zaista, na prvi pogled, u inak koncentracije kalijevih iona na apoptozu i proliferaciju se čini paradoksalnim: izlazak K^+ iona putem raznih tipova kalijevih kanala je nužan i vjerojatno ključan za apoptozu, dok isti tip kalijevih kanala reguliranih Ca^{2+} koji se aktivira tijekom smanjivanja stanice u apoptozi, potiče staničnu proliferaciju (Kunzelmann 2005). Ipak, tijekom apoptoze aktivacija kalijevih kanala je puno izraženija nego tijekom proliferacije (Yu i Choi 2000). Usto, izlazak K^+ iona tijekom apoptoze uvelike nadmašuje onaj tijekom aktivacije kalijevih kanala u tumorskim stanicama. Mnogi enzimi vezani za rast i mitozu zahtijevaju minimalnu koncentraciju kalija, pa je gubitak kalija smanjiti proliferativnu aktivnost. Zaključno, moglo bi se reći da veličina aktiviranog prijenosa i okolišni čimbenici pri kojima dolazi do aktivacije kanala u osnovi određuju hoće li doći do proliferacije ili apoptoze (Kunzelmann 2005).

Poticanje apoptoze u stanicama sa smanjenom unutarstaničnom koncentracijom kalija, značajno povećava aktivaciju programa stanične smrti. Smatra se da takva promjena u sadržaju kalija može biti ključni korak u odluci stanice da živi ili umre. Npr. nukleaze koje degradiraju DNA tijekom apoptoze i aktivnost kaspaze-3 pri fiziološkoj koncentraciji K^+ su u inkubitu inhibirane. Slično tome, *in vitro* aktivacija prokaspaze 3 pomoću dATP i citokroma *c* je u inkubitu inhibirana pri fiziološkoj koncentraciji K^+ (Hughes i sur. 1997). Dalje se pokazalo da valinomycin, ionofor za kalij, može inducirati apoptozu u normalnim stanicama sisavaca stimulirajući i izlazak kalija (Abdalah i sur. 2006; Yu i sur. 1997) i u tumorskim stanicama stimulirajući i izlazak kalija i izazivajući i depolarizaciju mitohondrijske membrane (Allbritton 1988; Inai i sur. 1997; Marklund i sur. 2001; Duke i sur. 1994). Dakle, prijelaz stanice iz stanja visokog u stanje niskog sadržaja kalija dopušta gubitak staničnog volumena i aktivaciju enzima uključenih u proces apoptoze. Očita je potencijalna klinička važnost u indukciji apoptoze, koji je ostvaren modulatorima K^+ protoka kao što su valinomycin i krunasti spojevi u kombinaciji s kemoterapeutcima, budući da stopa apoptoze više nego citotoksičnost ima važnu ulogu u reguliranju populacije tumorskih stanica (Marklund i sur. 2001).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Makrocikli i spojevi, a posebno krunasti eteri od ogromnog su značaja u kemiji i biologiji. Poznato je da se krunasti spojevi ponašaju vrlo slično prirodnim ionoforima i da neki djeluju citotoksično na tumorske stanice. Usto, poznato je da kalijev ionofor valinomycin izaziva apoptozu i posjeduje antitumorsku aktivnost *in vivo*. Ipak, iako su sintetizirani funkcionalizirani krunasti spojevi te su neki pokazali dobro antitumorsko djelovanje, sustavno istraživanje potencijalnog antitumorskog utjecaja nefunkcionaliziranih krunastih spojeva tek se počinje provoditi. Ovaj diplomski rad, nastavak je prvog sustavnog ispitivanja antiproliferativnog djelovanja makrociklikih spojeva, i to uglavnom krunastih etera.

Cilj ovog rada bio je ispitati antitumorski učinak 9 makrociklikih spojeva, većinom derivata krunastih etera. Istraživali smo njihov utjecaj na proliferaciju tumorskih stanica u linijama HeLa, SW620, MCF-7, H460 i MiaPaCa-2 metaboličkim testom MTT, te smo pokušali povezati strukturu s aktivnošću. Ovi rezultati će se iskoristiti za poboljšanje kompjuterskog modela za predviđanje aktivnosti na temelju strukture spojeva (tzv. QSAR model, od engl. *quantitative structure-activity relationship*) razvijenom tijekom predhodnih istraživanja, s dugoročnim ciljem to činiti *in silico* predviđanje aktivnosti različitih krunastih spojeva.

Osim toga, kako bi saznali više o mehanizmu djelovanja najaktivnijih spojeva, željeli smo odrediti njihov utjecaj na stanični ciklus metodom protone citometrije te dokazati aktivaciju apoptoze aneksin-V testom, specifičnim za detekciju i kvantifikaciju apoptotičnih stanica, prilagođenom za korištenje u protonej citometriji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Stani ne linije

Stani na linija je definirana populacija stanica dobivena iz po etne kulture prilago ena rastu u kulturi. U izradi ovog diplomskog rada korišteno je pet ljudskih stani nih linija (stani ne linije su nabavljene od American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, SAD):

- HeLa, epitelne stanice adenokarcinoma grli a maternice
- SW620, metastatske stanice adenokarcinoma debelog crijeva
- MCF7, metastatske epitelne stanice adenokarcinoma dojke
- MiaPaCa-2, stanice raka guštera e
- H460, metastatske stanice raka plu a

Sposobnost neograni enog dijeljenja, te genomska i kromosomska nestabilnost su neke od osnovnih osobina tumorskih stanica. Sukladno tome sve navedene stani ne linije imaju neograni en replikativni potencijal, te abnormalan genom i pove ani broj kromosoma.

3.1.1 Održavanje stani nih linija u kulturi

Tumorske stanice mogu rasti i u suspenziji za razliku od ve ine normalnih stanica. Korištene stani ne linije su adherentne i uzgajaju se tako da se prije dijeljenja pri vrste na plasti nu ili staklenu podlogu, koja je prije bila obra ena kako bi postala nabijena, što olakšava stanicama da se prihvate. Za uzgoj stanica potreban je teku i hranjivi nedefiniran medij, DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) sa serumom. DMEM sadrži:

- potrebne aminokiseline,
- vitamine,
- soli za održavanje osmotske ravnoteže,
- glukozu kao izvor ugljikohidrata,
- natrij bikarbonat kao pufer, u ravnoteži je s 5% -im CO₂ u inkubatoru i tako održava stalan pH oko 7.4,
- fenolno crvenilo kao pH indikator - crven je kod pH 7.4, mijenja boju u žuto kad pH padne ispod 6.8, a u alkalnom mediju postaje ljubi ast.

U takav medij dodaje se serum koji sadrži sve ostale sastojke potrebne za rast i razmnožavanje stanica, kao što su hormoni, faktori rasta, fibronektin, albumin, inhibitori

proteaza. U medij se dodaju i antibiotici kako bi sprje ili zaga enje kulture bakterijama. Takav kompletirani medij treba redovito mijenjati, budu i da tijekom stani nog disanja nastaju nusprodukti koji ga zakiseljavaju. Stani ne linije u bocama uzgajaju se u sterilnim uvjetima *in vitro*, u inkubatoru za stanice uz 5% CO₂, pri temperaturi 37 °C i visokoj relativnoj vlažnosti radi minimiziranja isparavanja vode iz medija. Kad dosegnu odre en stupanj konfluentnosti, stanice se razrijede ili presade da bi se održao zdravi rast u jednom sloju. Tijekom presa ivanja za odljepljivanje stanica koristi se otopina tripsina. Tripsin je serinska proteaza guštera e koja naj eš e cijepa peptidni lanac na karboksilnom kraju lizina ili arginina, te tako omogu ava odvajanje stanica jedne od druge i od podloge, pri emu se zaokruže. Laganim potresanjem boce pomogne se odvajanje stanica i dodaje se kompletirani medij da se inhibira daljnje djelovanje tripsina i time ošte enje stanica.

U ovom diplomskom radu stani ne linije održavane su u plasti nim polistirenskim bocama za stani ne kulture volumena 250 ml i 600 ml (Falcon, SAD). Dodan im je teku i medij DMEM (Gibco Invitrogen, SAD) komplementiran s 10% fetalnim gove im serumom, FBS (engl. *fetal bovine serum*, Gibco Invitrogen, SAD), 2 mM L-glutaminom (Sigma, SAD), 100 U/ml penicilinom (Eurobio, Francuska) i 100 µg/ml streptomycinom (Eurobio, Francuska) i stavljene su u inkubator za stanice (J.P.Selecta, Španjolska). Kad bi dosegle oko 75% konfluentnosti, naj eš e kroz 4 dana, stanice su razrje ene ili presa ene. Najprije je nad invertnim mikroskopom (Olympus CKX41, Japan) provjereno postojanje zaga anja (npr. bakterije, gljive, kvasci), uklonjen je medij iz boca, stanice su dvaput isprane s 5 ml 0,25%-og tripsina (Gibco, Invitrogen) i inkubirane na 37°C dok se nisu odljepile od podloge. Boce su lagano potresene i stanice su isprane s kompletiranim medijem. Dobivena je suspenzija pojedina nih stanica.

3.1.2 Brojanje stanica

Broj stanica odre en je pod svjetlosnim mikroskopom korištenjem tripanskog modrila (Sigma) koje razlikuje žive od mrtvih stanica, tzv. testom isklju ivanja boje. Mrtve stanice se boje plavo, jer imaju ošte enu membranu, pa se tripansko modrilo može apsorbirati, dok su žive stanice vrlo selektivne u propuštanju tvari kroz membranu i ostaju neobojene. Pomiješano je 20 µl stani ne suspenzije i 80 µl 0,03%-tnog tripanskog modrila. Time smo stanice razrijedili pet puta. U Neubauerovu komoricu za brojanje stanica dubine 0,1 mm nanesen je alikvot suspenzije. Ona je podijeljena u 9 ve ih kvadrata dimenzija 1 mm x 1 mm x 0.1 mm. Prebrojane su žive ili žive i mrtve stanice ovisno o pokusu u 4 vršna ve a kvadrata,

koji su podijeljeni u 16 identičnih manjih kvadrata, te je izrađunat broj stanica u 1 ml prema formuli:

$$\text{broj stanica/ml} = (n/4) \times 5 \times 10^4 \text{ stanica/ml}$$

3.2 Makrocikli ki spojevi

U radu su korišteni makrocikli ki spojevi (uglavnom krunasti eteri) sintetizirani u laboratorijima Instituta Ruđer Bošković ili komercijalno dostupni. Spojevi su označeni šifrom „LET-“, prema nazivlju preuzetom iz baze spojeva Laboratorija za eksperimentalnu terapiju, IRB-a. Svi spojevi su otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji 10^{-2} M.

Makrocikli ki spojevi s kojima su tretirane stanične linije:

1. LET-645 = 14,16-(1,3)adamantano-16-kruna-5 ili skraćeno Ad-16-K-5, pripravljen kako su opisali Mlinarić-Majerski i Kragol, 2001.
2. LET-611 = 2,18-[(1,3)2-oksaadamantano]-18-kruna-6 ili skraćeno OAd-18-K-6, pripravljen kako su opisali Mlinarić-Majerski i Kragol, 2001.
3. LET-612 = 2,18:9,11-bis[(1,3)2-oksaadamantano]-18-kruna-6 ili skraćeno DAd-18-K-6 pripravljen kako su opisali Mlinarić-Majerski i Kragol, 2001.
4. LET-640 = 8,10:18,20-bis[(1,3)adamantano]-20-kruna-6 ili skraćeno DAd-20-K-6 pripravljen kako su opisali Mlinarić-Majerski i Kragol, 2001.
5. LET-647 = bis(4-heksadecilbenzo)-18-kruna-6, pripravljen je kako su opisali Tušek i sur., 1974.
6. LET-613 = pripravu i strukturu nismo u mogućnosti prikazati zbog potencijalne patentne zaštite.
7. LET-648 = dibenzo-14-kruna-4 ili skraćeno DB-14-K-4, pripravljen prema malo izmijenjenom propisu Pedersena i sur., 1967.
8. LET-610 = 5,6,14,15-dibenzo-1,4-dioksa-8,12-diazaciklopentadeka-5,14-dien ili skraćeno DB-N2O2-15-K (Aldrich)
9. LET-646 = heksaciklen trisulfat (Fluka)
10. LET-329 = 4',4''(5'')-di-*tert*-butildicikloheksano-18-kruna-6 ili skraćeno DB-DcH-18-K-6, pripravljen je kako su opisali Tušek i sur., 1974.

U Tablici 1. su prikazane njihove oznake, nazivi i strukture.

Tablica 1. Oznake, skraćeni nazivi, imena i kemijske strukture makrocikličkih spojeva.

LET-645	Ad-16-K-5	14,16-(1,3)adamantano-16-kruna-5	
LET-611	OAd-18-K-6	2,18-[(1,3)2-oksaadamantano]-18-kruna-6	
LET-612	DAd-18-K-6	2,18:9,11-bis[(1,3)2-oksaadamantano]-18-kruna-6	
LET-640	DAd-20-K-6	8,10:18,20-bis[(1,3)adamantano]-20-kruna-6	
LET-647		bis(4-heksadecilbenzo)-18-kruna-6	
LET-648	DB-14-K-4	dibenzo-14-kruna-4	
LET-610	DB-N2O2-15-K	5,6,14,15-dibenzo-1,4-dioksa-8,12-diazaciklopentadeka-5,14-dien	
LET-646		heksaciklen trisulfat	
LET-329	DB-DcH-18-K-6	4',4''(5'')-di-tert-butildicikloheksano-18-kruna-6	
LET-613			

3.3 Ispitivanje antiproliferativnog u inka makrocikli kih spojeva in vitro

U inak spojeva na rast stanica u uvjetima *in vitro* ispitana je prema malo modificiranom postupku Ameri kog nacionalnog instituta za rak (National Cancer Institute, NCI, Developmental Therapeutics Program, <http://dtp.nci.nih.gov/>). Svaki test ispitivanja kemijskog spoja na stani noj liniji ponovljen je minimalno dva do etiri neovisna pokusa. Sve stani ne linije nasa ene su u etiriplikatu na standardne mikrotitarske plo ice sa 96 jažica na dan -1. Pomiješane su stanice u suspenziji i medij odre enih volumena da bi se dobio potreban broj stanica u volumenu potrebnom za nasa ivanje podešen s obzirom na vrijeme udvostru enja populacije stanica. U svaku jažicu je nasa eno 150 μ l stanica u slijede m broju: 3000 stanica/jažici za HeLa, SW620, MiaPaCa-2 i H460 stanice, te 4000 stanica/jažici MCF-7 stanica. Predzadnja kolona je ostavljena prazna, bez stanica, koja e služiti kao slijepa proba. Na posebnoj mikrotitarskoj plo ici, koja koristi kao tzv. po etna kontrola, tj. kao kontrola broja tek nasa enih stanica, svaka stani na linija nasa ena je u jednoj koloni u istom volumenu i broju, kao što je iznad napisano, a jedna kolona je ostavljena prazna za slijepu probu. Stanice su inkubirane 24 h da se prihvate za podlogu, rašire i po nu rasti. Na 0. dan, plo ica s po etnom kontrolom podvrgnuta je MTT testu, opisanom kasnije. Zatim je pripremljeno pet razrije enja spojeva u DMEM-u: 4×10^{-4} , 4×10^{-5} , 4×10^{-6} , 4×10^{-7} i 4×10^{-8} M. U svaku jažicu dodano je 50 μ l razrije enja spojeva navedenih koncentracija. Budu i da je ukupni volumen po jažici 200 μ l, kona ne ispitivane koncentracije bile su: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} i 10^{-8} M. Kontrolnim stanicama u zadnjoj koloni na plo ici dodano je 50 μ l medija. Nakon 72 h inkubacije stanice su podvrgnute MTT testu.

3.2.1 Test metil tiazolil tetrazolij (MTT)

Metaboli kim testom MTT mjeri se aktivnost enzima dehidrogenaza u vijabilnim stanicama. Dehidrogenaze reduciraju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT), žutu tetrazolijsku boju topivu u vodi, u ljubi asti formazanski produkt netopiv u vodi. Ljubi asti kristali se moraju otopiti u nekom otapalu, kako bi se mogao kvantificirati nastali produkt. Na kraju se intenzitet obojenja detektira spektrofotometrom i direktno je proporcionalan broju živih stanica.

Za optimalno provođenje ovog testa potrebno je odrediti stopu staninog rasta neposredno prije (početna kontrola, 0. dan) i 72 h nakon tretiranja s kemijskim spojevima. U tu svrhu je odstranjen medij u kojemu su stanice rasle, te je u svaku jažicu dodano 40 µl MTT reagensa (Sigma) u koncentraciji 2 µg/4 µl uključujući i u jažice bez stanica (slijepa proba). Nakon 4 h inkubacije pri 37 °C u tami, formazanski talozi su otopljeni u 160 µl DMSO uz tresenje. Apsorbancija (OD, optička gustoća) izmjerena je na spektrofotometru mikrotitarskih pločica Multiskan EX (Thermo Labsystems, Austrija) pri valnoj duljini od 570 nm pri kojoj formazanski produkt maksimalno apsorbira svjetlost. Izračunat je postotak rasta svih staninih linija prema jednom od slijedećih izraza:

- ako je $(\text{srednja OD}_{\text{test}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}}) \geq 0$, kemijski spoj pokazuje citostatički učinak i onda je:

$$\text{postotak rasta (\%)} = 100 \times (\text{srednja OD}_{\text{test}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}}) / (\text{srednja OD}_{\text{ctrl}} - \text{OD}_{\text{tzero}})$$

- ako je $(\text{srednja OD}_{\text{test}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}}) < 0$, kemijski spoj pokazuje citotoksični učinak i onda je:

$$\text{postotak rasta (\%)} = 100 \times (\text{srednja OD}_{\text{test}} - \text{srednja OD}_{\text{tzero}}) / (\text{srednja OD}_{\text{tzero}}),$$

gdje je:

- srednja OD_{test} - srednja vrijednost optičkih gustoća tretiranih stanica nakon 72 h (dan 3.)
- srednja OD_{tzero} - srednja vrijednost optičkih gustoća netretiranih stanica (dan 0.)
- srednja OD_{ctrl} - srednja vrijednost optičkih gustoća netretiranih stanica nakon 72 h (dan 3.).

Od svih vrijednosti optičkih gustoća (OD_{test}, OD_{tzero} i OD_{ctrl}) oduzeta je izmjerena OD slijepe probe.

3.3 Proto na citometrija

Protokolom citometrijom moguće je istodobno mjeriti i analizirati više fizičkih svojstava pojedinačnih stanica, najčešće stanica koje se kreću jedna iza druge u struji tekućine, a presijeca ih laserska zraka svjetlosti. Za analizu su pogodne suspendirane stanice ili stanice veličine od 0,2 do 150 µm. Stanice su obično obojane s jednom ili više fluorescentnih boja koje se direktno specifično vežu za stanične molekule, npr. DNA ili se vežu za antitijela omogućujući detekciju specifičnih proteina, npr. receptora. Na taj način dobivaju se podaci o relativnoj veličini stanica, zrnatosti ili unutarnjoj složenosti, te intenzitetu fluorescencije. Stanice raspršuju upadnu svjetlost i emitiraju apsorbiranu svjetlost u obliku fluorescencije. Intenzitet raspršenog svjetla sa stanice u istom smjeru s upadnom laserskom zrakom, *forward*

scatter (FSC), proporcionalan je veličini površine. Raspršena svjetlost koja se mjeri pod kutem 90° s obzirom na upadnu svjetlost, *side scatter* (SSC) daje informacije o unutrašnjoj kompleksnosti stanice. FSC i SSC vrijednosti se mogu koristiti za razlikovanje stanica njihovih tipova u heterogenom uzorku (npr. uzorak pune krvi). Mjerenjem fluorescencije dobivaju se podaci o molekulama obilježenim fluorokromima. Svaki dobiveni signal ima tri mjerljive veličine: visinu koja predstavlja najveći i intenzitet fluorescencije, širinu koja odgovara vremenu prolaska stanice kroz zraku svjetlosti i površinu odnosno ukupnu fluorescenciju površine. Tehnologija proto ne citometrije koristi se u brojnim područjima, a neke od primjena su: analiza stanica u toku ciklusa, stanica u toku smrti, određivanje ploidnosti stanice, klinička dijagnostika i praćenje bolesti (npr. poremećaja hematopoetskog sustava), praćenje terapijske učinkovitosti, mjerenje fosforiliranih proteina u toku razvoja signalnih puteva, određivanje proliferacije ugradnjom bromdeoksiuridina (BrdU), identifikacija i kvantifikacija parazita.

U ovom diplomskom radu metoda proto ne citometrije korištena je za analizu stanica u toku ciklusa i mjerenje apoptoze.

3.3.1 Priprema stanica za analizu stanica u toku ciklusa

Prije analize stanica u toku ciklusa na proto ne citometru prema sadržaju DNA potrebno je obilježiti stanice fluorescentnom bojom, kao što je propidij jodid (PI). Kako bi ta boja za označavanje uopće mogla ući u stanice koristi se etanol, koji permeabilizira i fiksira stanice. PI se proporcionalno interkalira u nukleinsku kiselinu – DNA i RNA, te količina fluorescencije odgovara količini nukleinskih kiselina u stanici. Međutim, treba se osigurati bojanje samo DNA, pa se stanicama prije dodaje enzim ribonukleaza A (RNaza A), koja cijepa RNA. Još treba napomenuti da otopina propidij jodida mora biti zaštićena od svjetlosti, jer se raspada na svjetlu.

Stanice raka gušterače, MiaPaCa-2, nasuene su u duplikatu, u volumenu 2 ml po bunari u koncentraciji 2×10^5 stanica po bunari u u plastične pločice sa 6 bunara a promjera 3,5 cm. Stanice su slijedeći dan nakon što su se prihvatile za podlogu tretirane željenim spojem. Odstranjen je medij i dodan novi tekuti medij sa spojem LET-613 u volumenu 2 ml po bunari u u dvije koncentracije: 1 μM i 10 μM . Kontrolnim stanicama dodano je 2 ml tekutog medija (negativna kontrola). Nakon 24 h, 36 h i 48 h inkubacije pokupljen je medij u zasebne epruvete. Bunari i sa stanicama su isprani s 1 ml PBS-a (engl. *phosphate buffered saline*). Dodano je 250 μl tripsina u svaki bunari i pločice su inkubirane 5 minuta. Stanice odljepljene od podloge isprane su s medijem iz odgovarajuće epruvete.

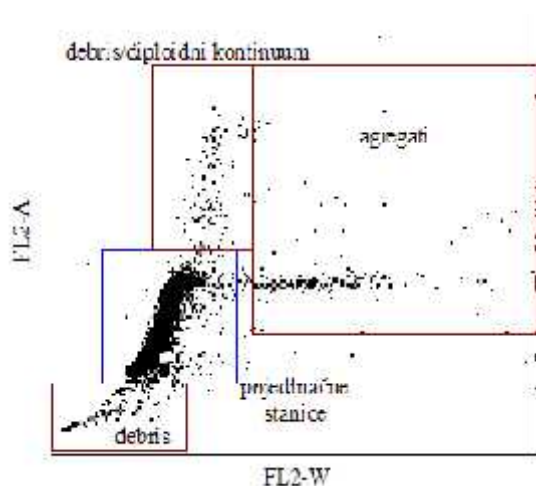
Zatim su stanice centrifugirane 5 minuta na 250 g i 4°C, odličen je supernatant, dodano im je 2,5 ml PBS-a i promiješane su. Taj postupak ponovljen je još dva puta, međutim zadnji put je dodano 1,5 ml PBS-a. U svaku epruvetu na vorteksu polagano je dodano 3 ml ledeno hladnog apsolutnog etanola (-20°C) koji je na taj način razrijeđen s prethodno dodanim PBS-om do volumnog udjela alkohola od 65%. Epruvete su pohranjene na -20°C. Na dan analize na proto nom citometru pripremljene su otopine RNaze A (Sigma, SAD) u koncentraciji 0,1 µg/µl i PI (Sigma, SAD) u koncentraciji 2,5 µg/ml, koja je umotana u foliju. Uzorci su centrifugirani 5 minuta na 250 g i 4°C. Pažljivo je odličen supernatant budući da se stanice resuspendirane u etanolu labavo vežu za podlogu. Stanice su isprane s 2 ml PBS-a. Ponovljen je postupak centrifugiranja i ispiranja. Stanice su opet centrifugirane pri istim uvjetima i odličen je supernatant. Potom je dodano 200 µl pripremljene otopine RNaze A, stanice su resuspendirane i inkubirane 15 minuta u vodenoj kupelji na 37°C. U epruvete za proto nom citometar (Falcon Becton Dickinson, SAD) prvo je dodana pripremljena otopina PI volumena 200 µl, pa resuspendirane stanice nakon inkubacije. Epruvete s uzorcima su stavljene na led, zamrznute i ostavljene minimalno 30 minuta da se PI veže za DNA, a zatim su analizirane na FACScalibur proto nom citometru (Becton Dickinson, SAD).

3.3.2 Analiza stani nog ciklusa

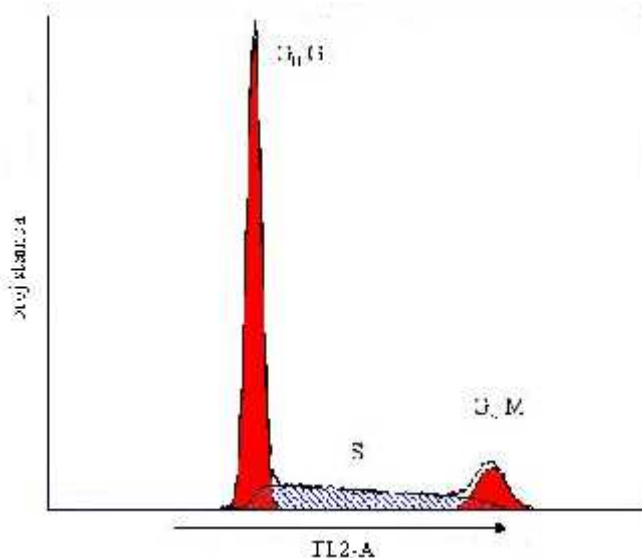
Analiza stani nog ciklusa proto nom citometrijom temelji se na određivanju stani nog sadržaja fluorescentno obilježene DNA i dekonvolucije histograma s jednim parametrom - količinom DNA fluorescencije. Stanice u G1 fazi stani nog ciklusa imaju jednu kopiju DNA, a stanice u G2 i M fazi već imaju udvostručenu DNA i sukladno tome dvostruki intenzitet fluorescencije. Budući da je kod stanica u S fazi sinteza DNA u tijeku, vrijednost fluorescencije je veća nego kod stanica u G1 fazi i manja nego kod stanica u G2/M fazi. Prema tome, na histogramu koji prikazuje koliko stanica sadrži određenu količinu DNA mogu se razlikovati tri populacije stanica: dvije Gausove krivulje odgovaraju stanicama u G1 fazi stani nog ciklusa i stanicama u G2/M fazi, a između je populacija stanica u S fazi.

U našim smo pokusima analizirali 20000 stanica po uzorku uz pomoć upravljačkog programa CellQuest (Becton Dickinson, SAD). Budući da su samo pojedinačne stanice potrebne i korisne za analizu, u toj kustom grafikonu prikazu (Slika 8) površina pulsa/širina pulsa (FL2-A/FL2-W) obuhvaćene su pojedinačne stanice i tako su isključeni agregati stanica i stani ni ostaci. Na histogramu (Slika 9) je prikazana ukupna fluorescencija stanica (FL2-A). S obzirom da se susjedne populacije stanica međusobno preklapaju, potrebno je koristiti

specifičan program/algoritam koji razdvaja populacije i određuje postotke stanica u G1, S i G2/M fazama prema površini ispod idealiziranih Gausovih krivulja (dekonvolucija histograma). U našim je pokusima korišten ModFit LT program (Verity Software House).



Slika 8. Primjer izdvajanja pojedinačnih stanica u grafikom prikazu površina pulsa/širina pulsa.



Slika 9. Primjer DNA histograma sa G0/G1, S i G2/M populacijama stanica koje se preklapaju.

3.3.3 Detekcija apoptoze metodom proto ne citometrije - Annexin V test

Za kvantitativno određivanje postotka stanica u apoptози proto nom citometrijom potrebno je obilježiti stanice s dvije fluorescentne boje, npr. aneksinom V konjugiranim s zelenim fluorokromom i crvenom **7-aminoaktinomycinom D** (7-AAD). Naime, u normalnim stanicama postoji asimetrija raspodjela fosfatidilserina u staničnoj membrani, tako da je smještan na citoplazmatskoj strani membrane. Međutim, u ranoj fazi apoptoze dolazi do prebacivanja fosfatidilserina s unutarnje na vanjsku stranu stanične membrane odnosno gubitka njezine asimetričnosti. Aneksin V je Ca^{2+} -ovisni vezujuć i protein koji ima veliki afinitet za fosfatidilserin na površini fosfolipidnog dvosloja, te se stoga aneksin V konjugiran s fluorescentnom bojom može koristiti za praćenje promjena fosfolipidne asimetrije u staničnoj membrani, odnosno detekciju stanica u procesu apoptoze. Budući da je kalcij potreban za vezanje aneksina na fosfatidilserin na apoptotičnim stanicama, prilikom pripreme stanica koristi se aneksin-vezujuć i pufer (engl. **annexin-binding buffer**, Ann BB) koji sadrži kalcij. Međutim, aneksin V konjugat također može proći kroz oštećenu membranu mrtvih stanica i vezati se za fosfatidilserin u unutrašnjosti stanice. Kako bi razlikovali mrtve od

apoptoti njih stanica potrebno je istodobno s aneksin V konjugatom koristiti boju koja obilježava samo nevjabilne stanice. Boja 7-AAD je takva vitalna fluorescentna crvena boja i ona se interkalira u dvola anu nukleinsku kiselinu. Ne prolazi kroz intaktnu membranu vijabilnih stanica, dok su membrane mrtvih i ošte enih stanica propusne za nju.

U ovom testu potrebno je dodatno pripremiti uzorke stanica tretiranih referentnim spojem koji aktivira apoptozu (pozitivna kontrola), tako da ih se oboji samo s po jednom fluorescentnom bojom te jedan uzorak ostavi s neobilježenim stanicama, da bi se mogla napraviti kompenzacija. Naime, emisijski spektri fluorokroma su široki i preklapaju se, te dio fluorescencijskog signala koji stiže do fotodetektora specifi nog za taj fluorokrom, potje e od drugog fluorokroma. Obilježavanjem stanica samo jednom fluorescentnom bojom, može se izmjeriti doprinos drugog signala, a proces oduzimanja neželjenog signala naziva se kompenzacija.

3.3.3.1 Priprema stanica za analizu apoptoze

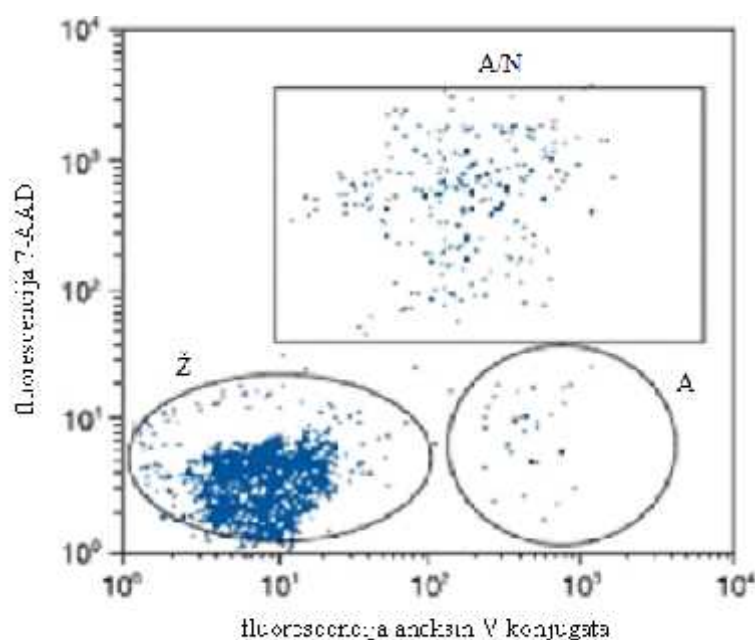
Stanice MiaPaCa-2 i SW620 su nasane na isti na in kao što je opisano u poglavlju 3.3.1. Slijede i dan je dodan teku i medij s makrociklim spojem LET-613 u tri koncentracije: 1 μ M, 5 μ M i 10 μ M, spoj LET-329 u koncentraciji 0,5 μ M i 1 μ M, valinomicin u koncentracijama 0,01 μ M i 0,05 μ M i kamptotecin (Sigma) u koncentraciji 10 μ M kao pozitivna kontrola (kamptotecin izaziva apoptozu u stanicama te se koristi za pra enje kvalitete provo enja pokusa). Nakon 48 h inkubacije stanice su isprane s 1 ml PBS-a s dodatkom 2% gove eg albumina iz seruma (engl. **bovine serum albumine**, BSA, Santa Cruz Biotechnology, SAD). Odljepljene su od podloge dodatkom 0,5 ml akutaze (Accutase, eBioscience, SAD), koja manje ošte uje stanice od tripsina, inkubirane su 5-10 min i isprane s 1 ml 2%-tnog BSA u PBS-u. Nakon centrifugiranja u svaku epruvetu je dodano 3 ml Ann BB, sastava: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 i pH 7,4. Stanice su ponovno centrifugirane i resuspendirane u Ann BB. Odre ena je gusto a stanica brojanjem pod mikroskopom i 120000 stanica svakog uzorka preba eno je u malu epruvetu. Isti broj stanica tretiranih kamptotecinom stavljeno je u svaku od etiri epruvete. Stanice su razrje ene s Ann BB i centrifugirane 5 min na 250 g. Odsisan je supernatant i svim uzorcima osim u tri uzorka stanica tretiranih kamptotecinom dodano je 20 μ l 7-AAD (Molecular Probes, Invitrogen) i 20 μ l aneksin V-aleksa fluor 488 konjugata (aneksin V konjugat, Molecular Probes, Invitrogen). Od preostala tri uzorka stanica tretiranih kamptotecinom, jedan je obojan samo s 7-AAD bojom, jedan samo sa aneksin V konjugatom i u jedan je dodan samo Ann BB i taj uzorak je

ostao nebojan. Uzorci su prekriveni aluminijskom folijom i inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je dodano 300 μ l Ann BB i otopine stanica su preba ene u epruvete za proto ni citometar na ledu. Uslijedila je analiza na proto nom citometru i obrada podataka.

3.3.3.2 Mjerenje apoptoze proto nom citometrijom

Prvo su analizirane nebojene stanice tretirane kamptotecinom i pritom su podešene voltaže detektora tako da se ve ina njih smjesti u donjem lijevom dijelu to kastog grafi kog prikaza 7-AAD/aneksin V konjugat (FL2-H/FL1-H) koji prikazuje samo autofluorescenciju stanica. Zatim su mjereni svi ostali uzorci (15000 stanica po uzorku).

Za ra unanje kompenzacije i odre ivanje postotka stanica u razli itim dijelovima grafi kog prikaza s dva parametra korišten je program FlowJo (TreeStar Inc., SAD). Tri populacije koje se mogu razlikovati na grafu (Slika 10) na temelju bojanja s aneksin V konjugatom i 7-AAD su:



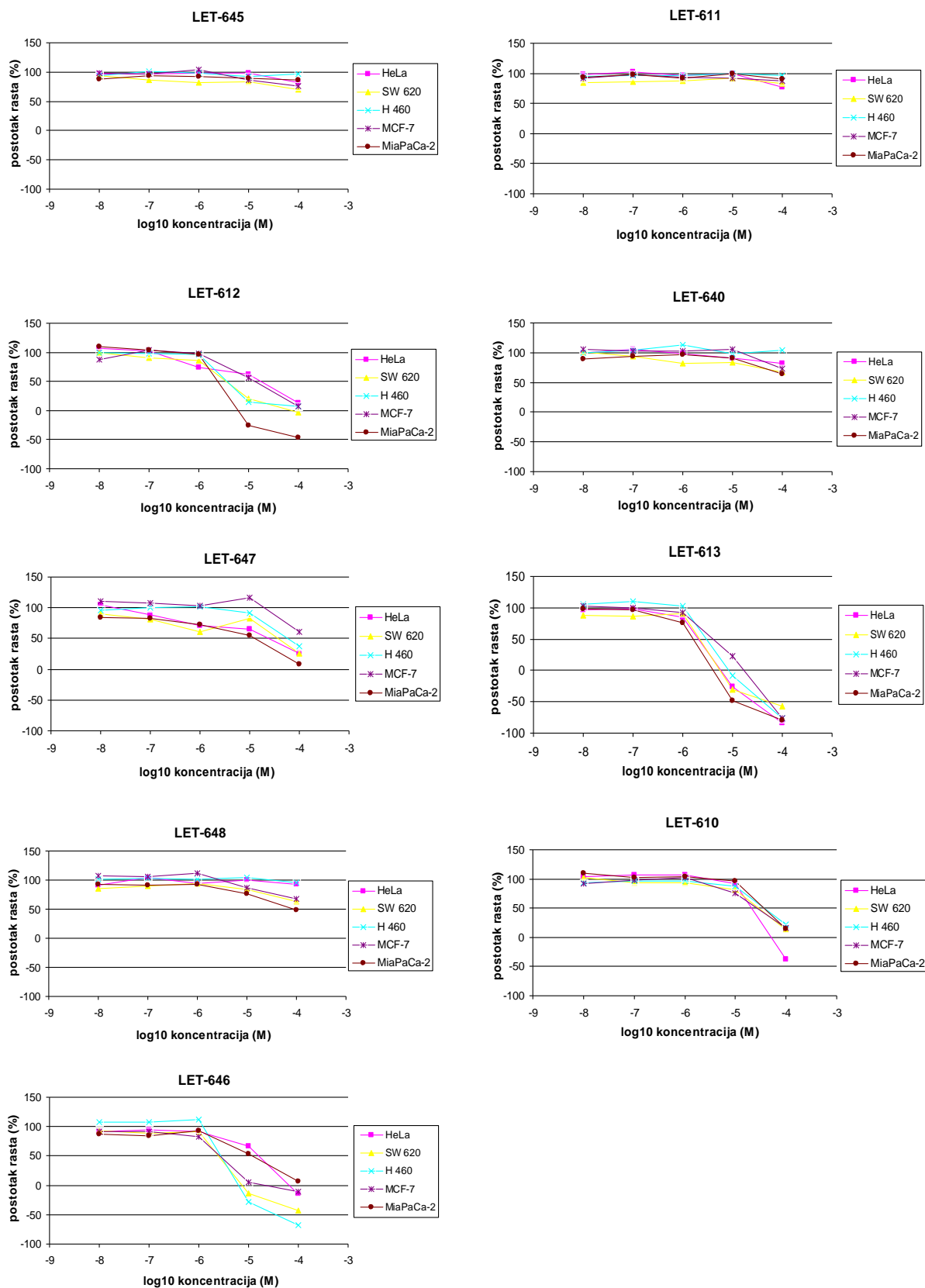
- 1) žive, dvostruko negativne stanice u donjem lijevom dijelu (Ž)
- 2) stanice u ranoj apoptozi, aneksin V konjugat pozitivne u donjem desnom dijelu (A)
- 3) stanice u kasnoj apoptozi ili nekrotične stanice, dvostruko pozitivne u gornjem desnom dijelu (A/N).

Slika 10. Primjer grafi kog prikaza fluorescencije stanica obilježenih aneksin V konjugatom i 7-AAD bojom s ozna enim razli itim populacijama stanica.

4. REZULTATI

4.1 Utjecaj makrocikli kih spojeva na proliferaciju tumorskih stanica

U ovom smo radu odredili utjecaj devet makrocikli kih spojeva na proliferaciju pet stanih linija tumora ovjeka (HeLa, SW620, H460, MCF-7, MiaPaCa-2) testom vijabilnosti (MTT test). Rezultate smo prikazali grafički i tabelarno. Grafički smo prikazali ovisnost postotka živih (vijabilnih) stanica (stanih) o rastu, PG – od engl. *percentage of growth*) o koncentraciji makrocikli kog spoja (Slika 11), tzv. *dose-response* krivulja.



Slika 11. Utjecaj makrocikličkih spojeva u koncentracijama 10^{-4} M do 10^{-8} M na rast tumorskih stanica navedenih linija HeLa, SW620, H460, MCF-7 i MiaPaCa-2 u uvjetima *in vitro*. Prikazane su krivulje ovisnosti postotka rasta stanica o koncentraciji spoja.

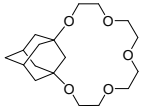
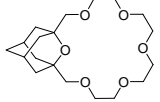
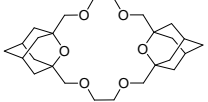
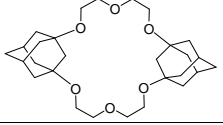
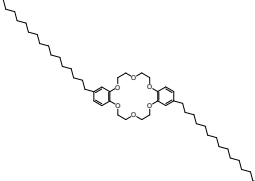
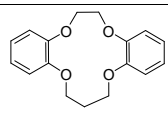
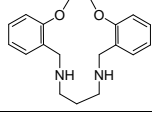
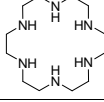
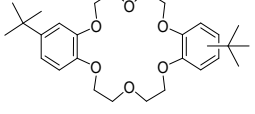
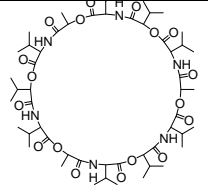
Iz dobivenih smo krivulja linearnom regresijom izračunali tzv. IC_{50} vrijednosti za svaku staničnu liniju (Tablica 2). Vrijednost IC_{50} (engl. *inhibitory concentration*) označava koncentraciju spoja potrebnu za inhibiciju rasta 50% stanica. Prilikom izračuna koristili smo izmjerene vrijednosti ispitivanih koncentracija koje odgovaraju postocima staničnog rasta iznad i ispod 50 %. Međutim, kad nijedna testirana koncentracija određene spoja na staničnoj liniji nije utjecala na pad stope rasta više od 50 %, zaključeno je da je IC_{50} veći od najveće koncentracije spoja koja je testirana (100 μ M) što se naznačuje kao $IC_{50} > 100 \mu$ M. Na taj smo način izbjegli pojavu velikih pogrešaka, kakve se javljaju u slučaju da se vrijednost IC_{50} ekstrapolira.

Osim toga, u Tablici 2 usporedno smo prikazali utjecaj spoja LET-329, kao i valinomicina, testiranih u prijašnjim pokusima, a prikazanim u radu Marjanović i sur. 2007. Iz Slike 11 i Tablice 2 jasno se vidi da testirani makrocikli koji spojevi pokazuju različiti antiproliferativni učinak na tumorske stanice. U ispitanim koncentracijama nakon 72 h neki spojevi pokazuju citostatičko, a neki citotoksično djelovanje. Slijedi objašnjenje postotaka rasta na grafovima:

- postotak rasta od 100 % odgovara vijabilnosti kontrolnih stanica nakon 72 h
- pozitivni postotak rasta od 0-100 % odgovara različitom stupnju usporavanja rasta stanica izazvanim spojevima s citostatičkim učinkom
- postotak rasta od 0 % označava potpunu inhibiciju rasta i jednaka je vijabilnosti stanica prije tretmana (dan 0.)
- negativni postotak rasta od 0 % do -100 % odgovara različitom stupnju ubijanja stanica, a njega izazivaju spojevi s citotoksičkim učinkom
- postotak rasta od -100 % označava da su sve stanice mrtve

Logično je i iz grafova se može vidjeti da je utjecaj makrocikličkih spojeva na smanjenje vijabilnosti stanica veći i što je koncentracija kemijskih spojeva viša.

Tablica 2. Utjecaj makrocikli kih spojeva na rast tumorskih stanica HeLa, MiaPaca-2, SW620, MCF-7 i H460. Prikazane su IC₅₀ vrijednosti za testirane spojeve određene MTT testom.

Makrocikli ki spoj	Struktura	IC ₅₀ ^a (μM)				
		HeLa	MiaPaCa-2	SW 620	MCF-7	H 460
LET-645 Ad-16-K-5		>100	>100	>100	>100	>100
LET-611 OAd-18-K-6		>100	>100	>100	>100	>100
LET-612 DAd-18-K-6		17±3	2±0	3±1	13±9	4±1
LET-640 DAd-20-K-6		>100	>100	>100	>100	>100
LET-647 Bis(4-heksadecil benzo)-18-K-6 ^b		25±27	12±5	100	>100	63±38
LET-613 648 DB-14-K-4		2,3±1,4	1,7±0,6	2,6±1,9	4±0,7	4±3
LET-610 DB-N2O2-15-K		21±4	38±1	29±12	27±12	38±10
LET-646 Heksaciklen trisulfat		16±10	11±8	2±1	3±0.6	3±0.9
LET-329 DB-DcH-18-K-6 ^c		0,3±0,04	0,3±0,2	0,3±0,2	0,2±0,05	0,7±0,4
valinomycin ^c		0,001	0,001	0,0001	0,5±0,1	0,001

^a IC₅₀ = koncentracija koje je potrebna za inhibiciju rasta 50% stanica.

^b = spoj je taložio pri višim koncentracijama, što je onemogućilo precizno određivanje IC₅₀.

^c = rezultati preuzeti iz Marjanović i sur. 2007.

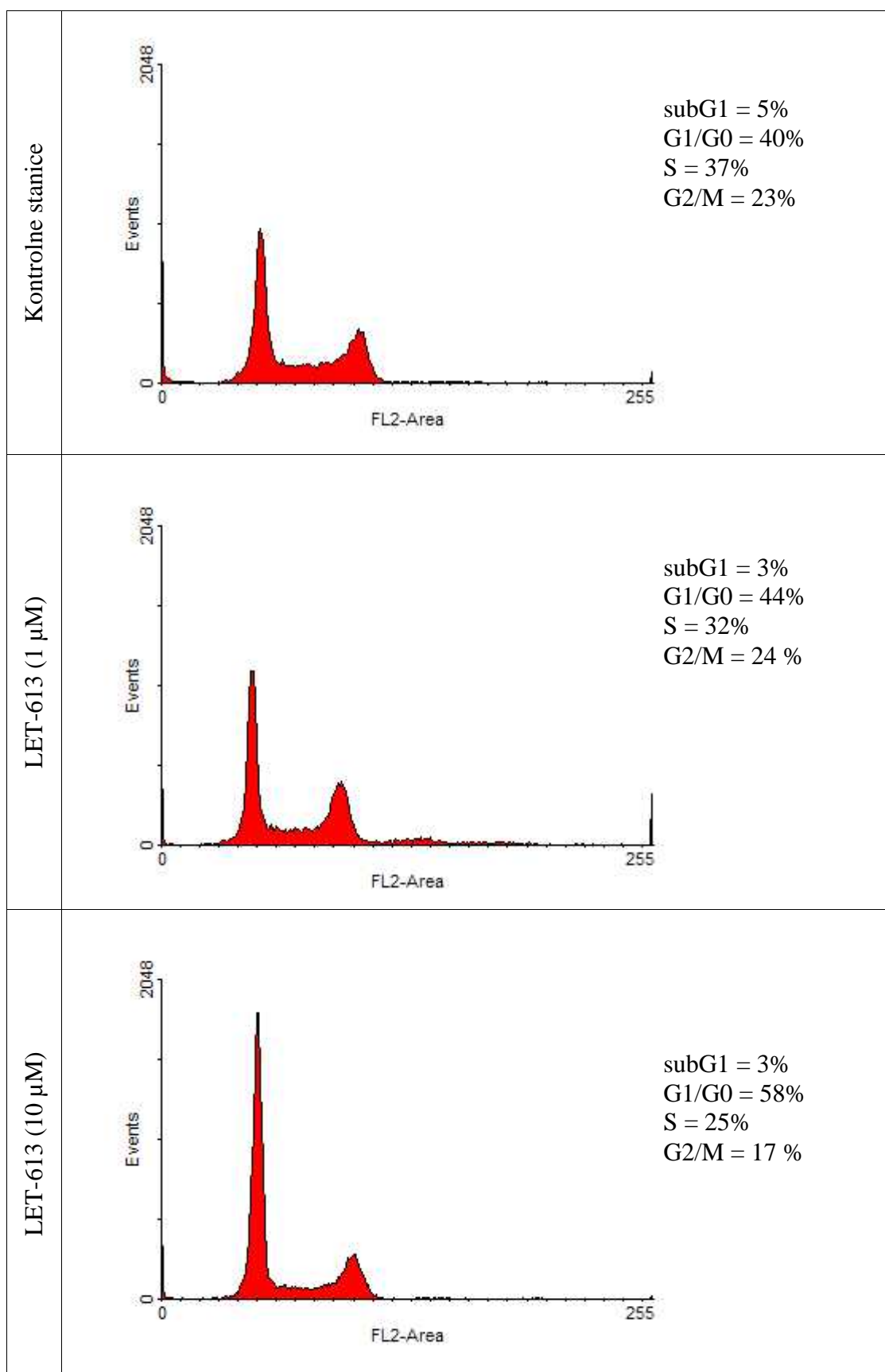
Kod većine spojeva ne postoji značajna razlika u jačini djelovanja pojedinog spoja na različite stanične linije, niti se može uočiti da je jedna stanična linija otpornija ili osjetljivija na djelovanje više makrocikličkih spojeva.

Kao što je već spomenuto, rezultati pokazuju da testirani spojevi ispitani na tumorskim linijama u ovom diplomskom radu imaju različit antiproliferacijski utjecaj. Primjerice, spojevi LET-611 i LET-645 nemaju inhibični učinak na proliferaciju staničnih linija, niti u najvećoj koncentraciji 10^{-4} M. Zatim, spoj LET-640 u koncentraciji 10^{-4} M pokazuje vrlo slab inhibični utjecaj na sve stanične linije osim H460, dok spoj LET-648 isto slabo, ali malo jače inhibira rast svih stanica osim H460 i HeLa. Možemo primjetiti da spoj LET-647 usporava rast stanica, ali treba napomenuti da je izrazito taložio u višim koncentracijama što je dovelo do velikih razlika u četiri odvojena MTT testa i time se onemogućila visoka preciznost u izradi krivulje rasta zbog njegove slabe topljivosti. Spoj LET-610 ima umjereno inhibičijsko djelovanje u najvećoj koncentraciji (10^{-4} M), pogotovo kod stanica HeLa. S druge strane, spoj LET-612 već u koncentraciji od 10^{-5} M pokazuje zamjetni inhibični učinak, a u većoj koncentraciji inhibični učinak je malo izraženiji. Uočavamo i veću osjetljivost stanica MiaPaCa-2 na djelovanje tog spoja. LET-646 ima sličan, ali malo jači inhibični utjecaj od LET-612 na sve stanične linije. Na kraju, spoj LET-613 je pokazao najjače inhibičijsko djelovanje od svih testiranih makrocikličkih spojeva: pri koncentraciji 10^{-5} M ima snažan inhibični učinak i u najvećoj koncentraciji ima jaki citotoksični učinak. Slično, ali još puno jače antiproliferacijsko djelovanje pokazuje makrociklički spoj LET-329, za koji je ranije ustanovljeno da već u koncentraciji 10^{-6} M ima vrlo izražen inhibični učinak. Isto tako, prethodno je u laboratoriju utvrđeno da prirodni ionofor valinomycin, posjeduje vrlo jak inhibični učinak, s IC_{50} u nanomolarnom rasponu.

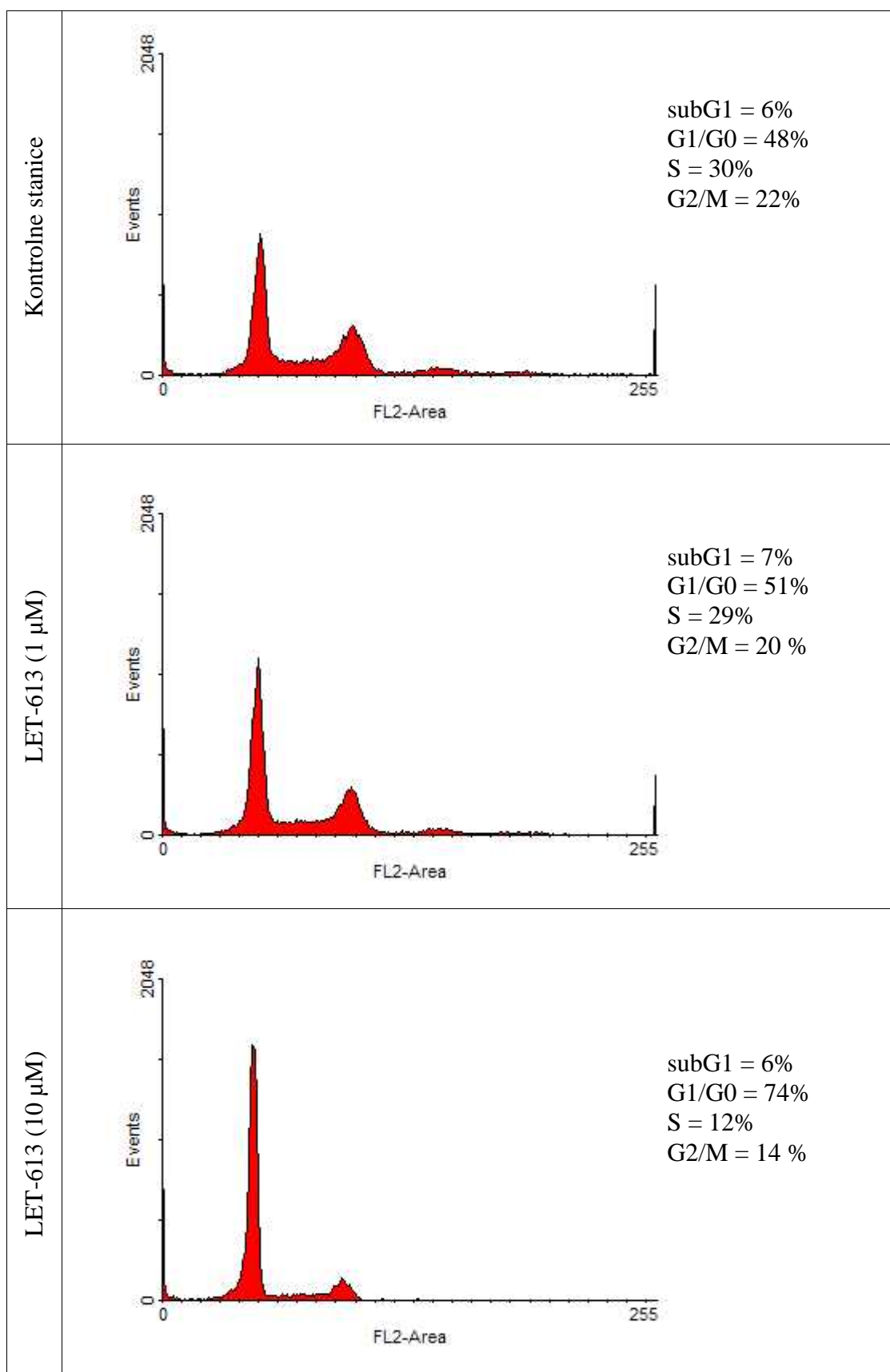
4.2 Analiza utjecaja makrocikli kog spoja LET-613 na stani ni ciklus

Kako bismo saznali više o mehanizmu djelovanja najaktivnijeg makrocikli kog spoja na proliferaciju stanica, odredili smo njegov u inak na stani ni ciklus stanica raka guštera e MiaPaCa-2 metodom proto ne citometrije. Stanice su inkubirane sa spojem LET-613 u koncentraciji nešto nižoj i otprilike pet puta višoj od vrijednosti IC_{50} za MiaPaCa-2 stanice ($1 \mu M$, odnosno $10 \mu M$). Analizu stani nog ciklusa proveli smo nakon 24 h, 36 h i 48 h. Dobiveni DNA histogrami s postocima stanica u pojedinima fazama stani nog ciklusa prikazani su na Slikama 12-14, pri emu subG1 populacija ispred G1 pika uklju uje stanice u apoptozi, mrtve stanice, te jezgrine ostatke. Kako bi se jasnije vidjeli rezultati, grafi ki smo još prikazali kako se mijenja postotak stanica nakon tretmana sa spojem LET-613 u dvije koncentracije po fazama stani nog ciklusa (Slika 15).

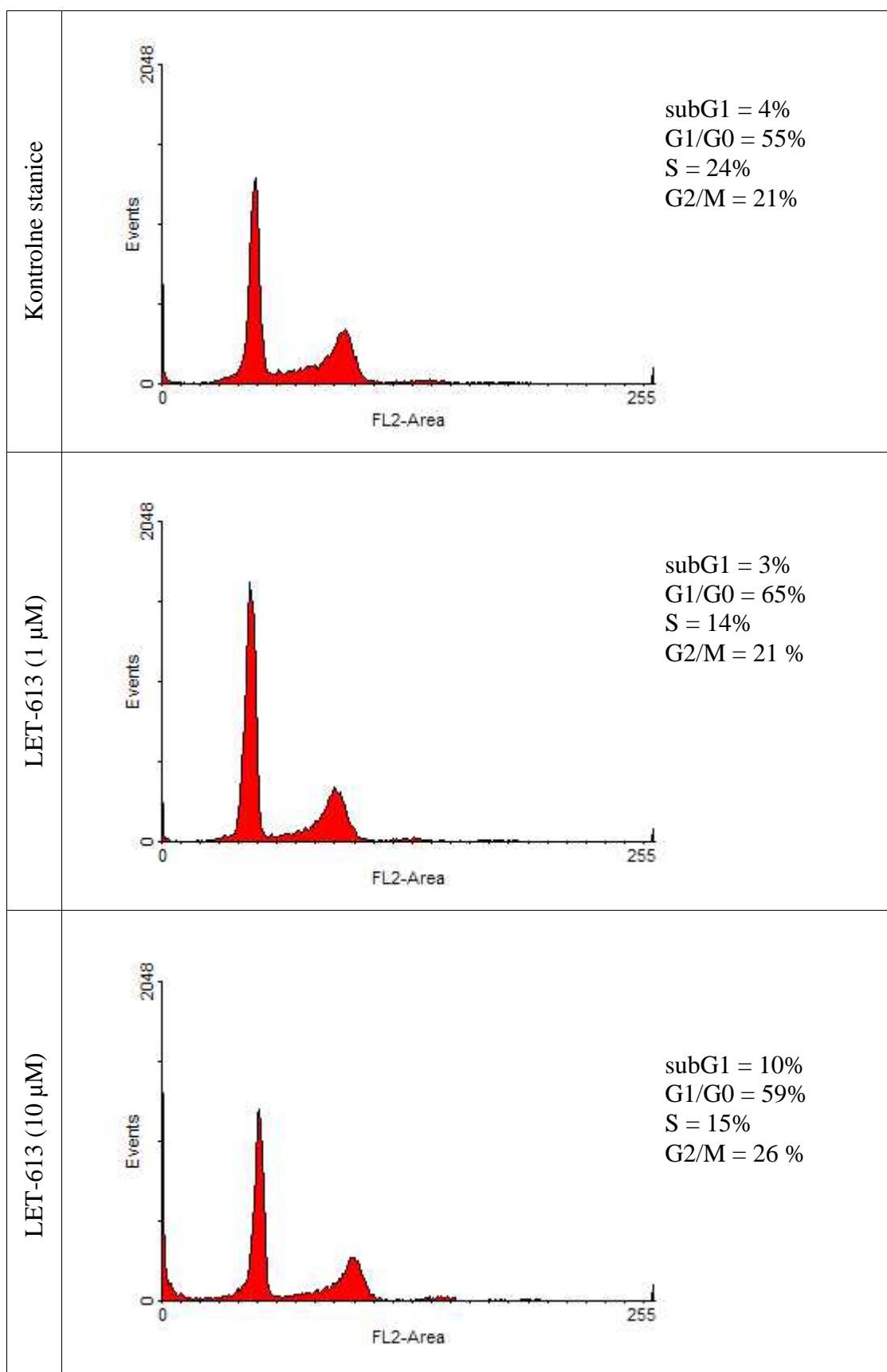
Utjecaj testiranog spoja na stani ni ciklus ovisi o vremenu inkubacije stanica i o njegovoj koncentraciji. Najve i utjecaj na stani ni ciklus primje uje se kad su MiaPaCa-2 stanice bile izložene spoju LET-613 u koncentraciji od $10 \mu M$ tijekom 36 h. Ranije je utvr eno (Marjanovi i sur. 2007) da spoj LET-329, kao i valinomicin ve nakon 24 h izazivaju nakupljanje stanica u G1 fazi i smanjenje broja stanica u S fazi, sli no kao i ovdje ispitani spoj LET-613 u višoj koncentraciji. Me utim, valinomicin tako er dovodi do velikog pove anja subG1 populacije, ve nakon 24 h, što nije uo eno kod stanica tretiranih s LET-613. Tek nakon 48 h izlaganja stanica višoj koncentraciji spoja LET-613 izazvao je zna ajno pove anje subG1 populacije (za 6%). Spoj LET-613 u nižoj koncentraciji nakon 24 h inkubacije, ima isti, ali dosta slabiji u inak na stani ni ciklus od onog u višoj koncentraciji. Do snažnog zaustavljanja MiaPaCa-2 stanica u G1 fazi i velikog smanjenja broja stanica u S fazi dolazi nakon 36 h izlaganja višoj koncentraciji spoja LET-613, dok niža koncentracija nema u inka. Nasuprot tome, nakon 48 h inkubacije stanica s nižom koncentracijom spoja LET-613, dolazi do zaustavljanja stanica u G1 fazi, dok viša koncentracija spoja izaziva apoptozu stanica koje su bile zaustavljene u G1 fazi.



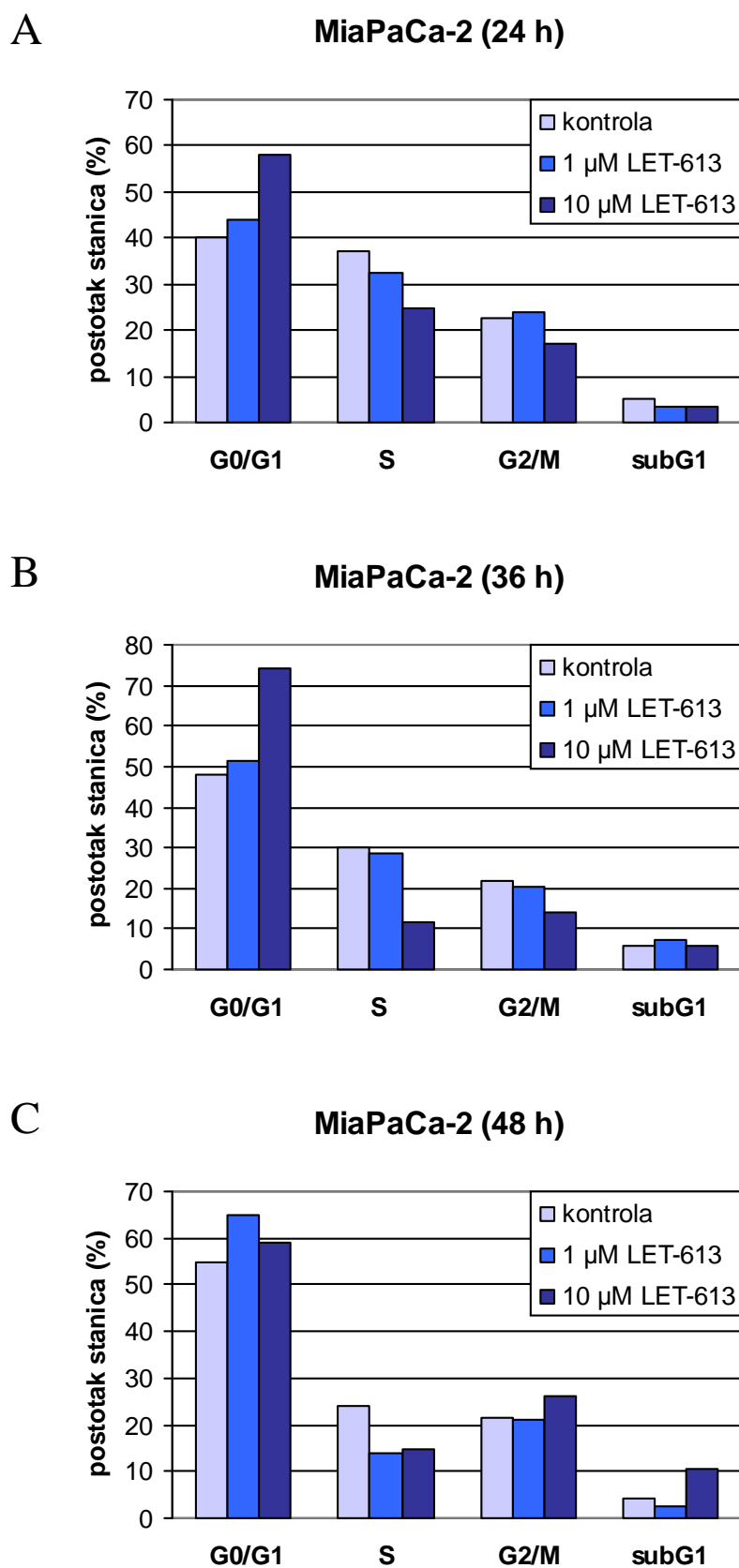
Slika 12. DNA histogrami i postoci stanica u fazama stani nog ciklusa nakon **24 h** inkubacije MiaPaCa-2 stanica sa spojem LET-613 koncentracije 1 μ M i 10 μ M.



Slika 13. DNA histogrami i postoci stanica u fazama stani nog ciklusa nakon **36 h** inkubacije MiaPaCa-2 stanica sa spojem LET-613 koncentracije 1 μ M i 10 μ M.



Slika 14. DNA histogrami i postoci stanica u fazama stani nog ciklusa nakon **48 h** inkubacije MiaPaCa-2 stanica sa spojem LET-613 koncentracije 1 μ M i 10 μ M.



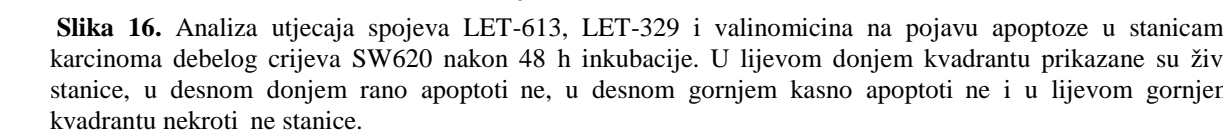
Slika 15. Utjecaj spoja LET-613 u koncentraciji 1 μ M i 10 μ M na udio stanica MiaPaCa-2 u fazama stani nog ciklusa nakon **24 h** (A), **36 h** (B) i **48 h** (C).

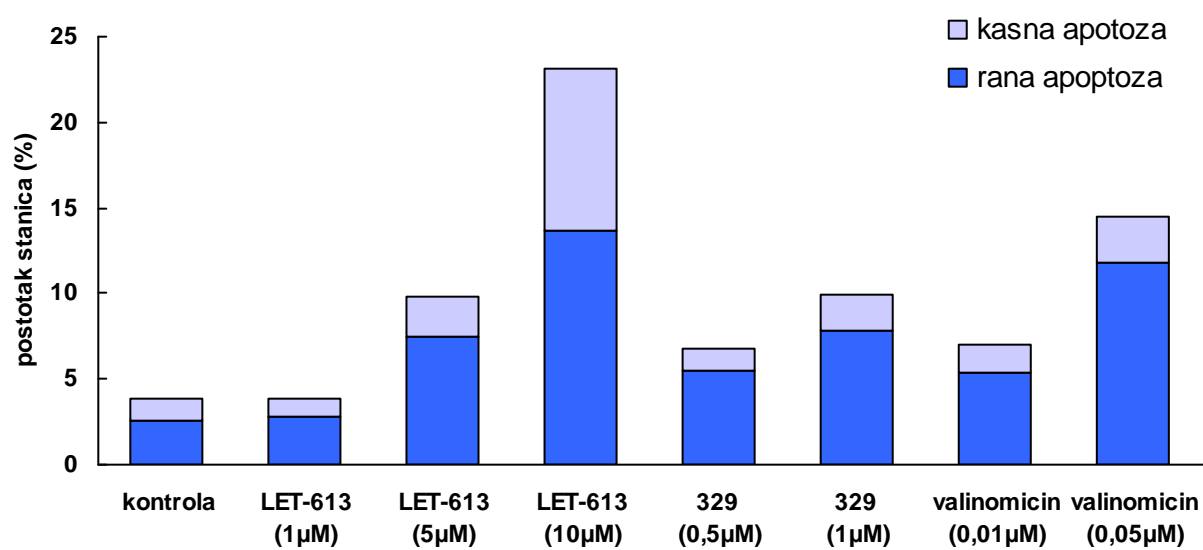
4.3 Detekcija i kvantifikacija apoptoze

Kako bismo dokazali da povećani postotak stanica u subG1 fazi zaista upućuje na aktivaciju apoptoze u stanicama tretiranim spojem LET-613 dodatno smo primjenili aneksin V test, kao metodu za specifično dokazivanje i kvantificiranje apoptoze. Također smo, paralelno, testirali i u inak prethodno ispitivanog spoja LET-329, koji je također utjecao na porast broja stanica u subG1 fazi (Marjanović i sur. 2007) te valinomicina.

Iako smo pokuse započeli sa stanicama MiaPaCa-2, kao nastavak prethodnih ispitivanja staničnog ciklusa, iz rezultata, u nekoliko ponovljenih pokusa, nije se mogao jednoznačno odrediti točan postotak stanica u apoptozi. Ovaj je problem vjerojatno posljedica specifičnosti stanične linije, a koju nismo mogli otkloniti. Stoga smo odlučili da u narednim pokusima koristimo staničnu liniju karcinoma debelog crijeva, koja je također bila osjetljiva na djelovanje spoja LET-613. Stanice SW620 inkubirane su 48 h spojevima: LET-613 u koncentracijama 1 μM , 5 μM i 10 μM ; LET-329 u koncentracijama 0,5 μM i 1 μM ; valinomicinom u koncentracijama 0,01 μM i 0,05 μM , te je jedan uzorak ostao netretiran da bi nam poslužio kao negativna kontrola. U grafikonu prikazu dobivenom mjerenjem na protom citometru u uglovima kvadranta na Slici 16, označeni su postoci živih stanica (lijevi, donji kvadrant), stanica u ranoj apoptozi (desni, donji kvadrant), stanica u kasnoj apoptozi (gornji, desni kvadrant) i mrtvih stanica (gornji, lijevi kvadrant) čiji je ukupan zbroj 100%. O utjecaju pojedinog spoja na izazivanje apoptoze govore nam dobiveni postoci stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (desni donji i gornji kvadranti na Slici 16) uspoređujući ih s netretiranim uzorkom, koji su također radi bolje preglednosti prikazani na Slici 17.

Rezultati su pokazali da spojevi LET-613, LET-329 i valinomicin aktiviraju apoptozu u stanicama raka debelog crijeva SW620. Naime, uzorci tretirani spojevima LET-613, LET-329 i valinomicinom imaju povećani udio apoptotičnih stanica u odnosu na kontrolu (Slike 16 i 17). Taj uinak na aktivaciju apoptoze ovisan je o koncentraciji testiranog spoja, tako da otečaj raste s višom koncentracijom. Makrociklički spoj LET-613 u najmanjoj ispitanoj koncentraciji (1 μM) ne dovodi do porasta broja apoptotičnih stanica, dok u većim koncentracijama izaziva povećanje udjela rano i kasno apoptotičnih stanica u odnosu na kontrolu, posebno u koncentraciji 10 μM gdje je izmjereno 14% stanica u ranoj te 9% stanica u kasnoj fazi apoptoze. Spojevi LET-329 i valinomicin imaju sličan utjecaj: u ispitanim nižim koncentracijama (0,5 μM za LET-329 i 0,01 μM za valinomicin), gdje je izmjereno oko 5% stanica u ranoj apoptozi, dok su u višim koncentracijama (1 μM za 329 i 0,05 μM za valinomicin) značajnije aktivirali apoptozu (8, odnosno 12%).





Slika 17. Udio apoptotskih stanica SW620 nakon 48 h inkubacije spojevima LET-613, LET-329 i valinomycin u različitim koncentracijama.

5. RASPRAVA

U ovom radu istraživali smo djelovanje makrocikličkih spojeva na proliferaciju, stanični ciklus i apoptozu različitih tumorskih stanica i njihovih linija. Iako je sinteza i struktura većine ovih spojeva bila poznata iz literature, do sada nitko nije istraživao njihov utjecaj na rast tumorskih stanica.

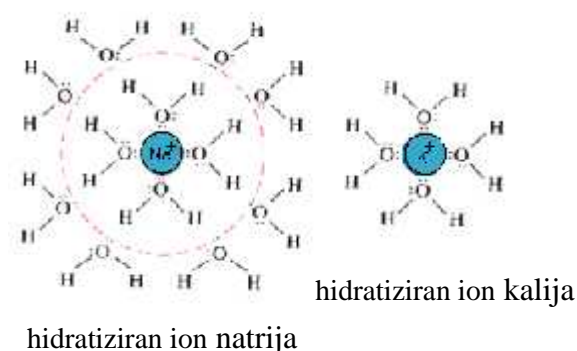
Krunasti spojevi se ponašaju vrlo slično prirodnim ionoforima, te je odavno poznato da djeluju citotoksično na stanice sisavaca, uključujući i tumorske stanice (Kralj i sur. 2008). Za kalijev ionofor valinomycin već se dugo zna da posjeduje antitumorsku aktivnost *in vivo* (Kleuser i sur. 1985), međutim njegovo korištenje je ograničeno zbog prevelike toksičnosti, iako se pokazalo da bi se ugradnjom u liposome mogla znatno smanjiti toksičnost i pritom održati antitumorska učinkovitost (Daoud i Juliano 1986). Nedavno se utvrdilo da hidrafilni, sintetski kanalima-slični ionofori građeni od tri jedinice diaza-18-kruna-6, razdvojene različitom dugom alkilnim lancima, utječu na poremećeni transport iona i na taj način ostvaruju svoje citotoksično djelovanje u tumorskim stanicama *in vitro* (Leevy i sur. 2005a). Osim toga, sintetizirani su brojni krunasti eteri na kojima je kao supstituent vezana funkcionalna grupa zadužena za antitumorsku aktivnost (npr. DNA-interkalator) i neki od njih su pokazali dobro antitumorsko djelovanje, ali sustavno istraživanje potencijalne antitumorske aktivnosti nefunkcionaliziranih krunastih spojeva tek se počelo provoditi (Kralj i sur. 2008). Marjanović i suradnici (2007) su utvrdili da antiproliferativni učinak 14 krunastih spojeva snažno ovisi o tipu hidrofilne šupljine i karakteristikama hidrofobnog prstena, te ovaj diplomski rad je nastavak tog prvog sustavnog istraživanja.

Za određivanje antiproliferativnog učinka odabrano je 5 derivata 18-kruna-6 (LET-645, LET-611, LET-612, LET-613 i LET-647), 2 derivata s manjim makrocikličkim prstenom od 14 (LET-648) i 15 atoma (LET-610), derivat s prstenom od 20 atoma (LET-640) i jedan analog 18-kruna-6 (LET-646). 18-kruna-6 (18-K-6) je prvi otkriveni i najistraživaniji krunasti spoj koji posjeduje vrlo slab inhibitory učinak na rast stanica (Marjanović i sur. 2007). Ciklički polietari stvaraju kompleks s kationom okružujući i ga s elektronegativnom okolinom kisikovih atoma i ion biva zaštićen u kompleksu od okolnog nepolarnog otapala (Mlinarić-Majerski i Kragol 2001), odnosno stanične membrane. Planarna polieterska šupljina 18-kruna-6 zapravo je idealna za kompleksiranje kalijevih iona, ali apikalni dijelovi kompleksa nisu dobro zaštićeni od hidrofobnog okruženja, kakvo je u membrani. To daje priliku stvaranja interakcija kompleksa npr. s anionima i otapalom, koji apikalno solvativiraju inače

dvodimenzionalno koordiniran kation (Gokel i sur. 2004). Te interakcije postaju puno manje izražene u prisutnosti supstituenta i pokazalo se da derivati 18-K-6 s različitim supstituentima (di-*tert*-butil-dicikloheksil, dibenzil itd.) imaju puno jači i antiproliferativni učinak. Dakle, važnost supstituenta leži u tome što oni povećavaju hidrofobnost spoja, a smatra se i da hidrofobno okruženje omogućava ugradnju u membranu i time prijenos kationa (Marjanović i sur. 2007). Budući da je poznato da krunasti eteri s 18 članova u prstenu više utječu na povećanje membranske propusnosti kalijevih, nego natrijevih i kalcijevih iona (Naumowicz i sur. 2003), pretpostavlja se da je razlika u prijenosu kalijevih iona odgovorna za antiproliferativno djelovanje (Marjanović i sur. 2007). Koliko će se kationa vezati i dalje prenijeti kroz membranu, ovisi o tome koliko dobro kation pristaje u makrocikličku šupljinu, ali također i o lakoći kojom kation odlazi s nosača (makrocikličkog spoja) na površini membrane (Mlinarić-Majerski i Kragol 2001). Gad i suradnici (1985) su pokazali da relativna uspješnost raznih krunastih spojeva u povećanju prijenosa fiziološki važnih kationa preko umjetne fosfolipidne membrane ovisi o konstanti vezanja iona, pH, koncentracijama iona i ionofora i prisutnosti drugih iona. Drugim riječima, mehanizam kojim krunasti eteri olakšavaju prijelaz kroz biološku membranu vrlo je složen i vezne konstante bilo za kalij, natrij, kalcij ili druge važne ione svakako nisu najvažniji parametri prijenosa. Budući da vezne konstante iona i ionska selektivnost ovise o otapalu kao i o ligandu, sposobnost makrocikličkih spojeva da specifično djeluje na ionski prijenos u staničnoj membrani uvelike ovisi o molekularnom okolišu u membrani. Može se pretpostaviti da je efekt otapala primarno posljedica razlika u solvataciji iona i liganda (Marjanović i sur. 2007). Za valinomicin je npr. poznato da mu nabor prstena, stabiliziran vodikovim vezama,

dopušta da potpuno okruži jedan nehidratiziran ion kalija (Slika 18). Šest atoma kisika stupaju u interakciju s vezanim K^+ , zamjenjuju i kisikove atome iz vode koja ga je hidratizirala. Manji natrijev ion ne može istovremeno stupiti u interakciju sa šest kisikovih atoma u valinomicinu. Stoga je energetski nepovoljnije da se Na^+ dehidratizira kako bi stvorio kompleks s valinomicinom.

U radu smo ispitali antiproliferativni utjecaj 4 krunasta etera supstituirana s adamantanskim i oksadamantanskim jedinicama (LET-611, LET-612, LET-640 i LET-645).



Slika 18. Hidratizirani ioni natrija i kalija

Odabrali smo te spojeve jer se može pretpostaviti da se ugradnjom oksa- ili adamantanskog rigidnog gra evnog bloka u makrocikli ki prsten smanjuje konformacijska pokretljivost krunastih etera i tako omogućuje bolje i selektivnije vezanje kationa, te da ti lipofilni centri olakšavaju ugradnju u membranu i na taj način poboljšavaju prijenos kationa. Oksadamantanska jedinica još usto sudjeluje u kompleksiranju kationa (Mlinaric-Majerski i Kragol 2001). Testirana su dva takva spoja s 18 članova u prstenu: DAd-18-K-6 (LET-612) s dvije i OAd-18-K-6 (LET-611) s jednom oksadamantanskom jedinicom. Prije je pokazano da oba spoja jače vežu kalijeve ione od svih iona alkalijskih metala, ali imaju smanjenu Na^+/K^+ selektivnost u odnosu na 18-K-6. Premda je ionofor LET-612 vezao više iona kalija od spoja LET-611, sporije je prenosio ione kroz organsku membranu vjerojatno zbog slabog otpuštanja K^+ (Mlinaric-Majerski i Kragol 2001). Krunasti eter DAd-18-K-6 (LET-612) pokazao je jak inhibitorni učinak na rast tumorskih stanica, dok LET-611 nije bio aktivan što se slaže s izražavanjem molekularne mehanike. Prema tim izražavanjima oba ionofora su najpogodnija za stvaranje kompleksa s K^+ , kojem veličina šupljine idealno odgovara (Mlinaric-Majerski i Kragol 2001). Međutim, sterički faktori uvjetuju vrlo učinkovito kompleksiranje LET-612 s K^+ i pomažu u njih se može objasniti aktivnost ionofora LET-612. Naime, zbog steričkih odbijanja dvije oksadamantanske jedinice, smanjena je konformacijska pokretljivost prstena i zato je spoj LET-612 bolje preorganiziran da veže K^+ , nego što je krunasti eter LET-611 sa samo jednom oksadamantanskom jedinicom. Usto, pokazalo se da kompleks kalijevog iona sa šest eterskih kisika ionofora LET-612 stabilizira makrocikli ki prsten (Mlinaric-Majerski i sur 2000), te jedna oksadamantanska jedinica zauzima prostor ispod, a druga prostor iznad ravnine makrocikli kog prstena. Takva struktura kompleksa je vrlo pogodna, jer te oksadamantanske jedinice sterički „pridržavaju“ ion kalija unutar makrocikli ke šupljine (Mlinaric-Majerski i Kragol 2001), te ga kao lipofilni blokovi vjerojatno štite od hidrofobnog okruženja u membrani, dok to nije moguće za spoj LET-611 sa samo jednom oksadamantanskom jedinicom. Neaktivnosti manje simetri nog spoja 611 još ide u prilog zapažanje da manje simetri ni krunasti eteri općenito imaju nižu sposobnost vezanja kationa nego simetri ne krune (Ouchi i sur. 1984).

Krunasti eter DAd-20-K-6 (LET-640) s dvije adamantanske jedinice ima zanemarivo slabo inhibicijsko djelovanje kao i Ad-16-K-5 (LET-645) s jednom adamantanskom, što se može povezati sa dosadašnjim zapažanjima. Zabilježeno je da oba spoja imaju neznatnu sposobnost stvaranja kompleksa s kationima alkalijskim metala (Mlinaric-Majerski i Kragol 2001). Također, Ouchi i suradnici (1984) su primijetili da krunasti eteri s produljenim etilnim jedinicama izmeću kisika u prstenu (npr. propilnim) imaju promijenjenu selektivnost vezanja

iona, tako da puno slabije vežu alkalijske katione vjerojatno zbog povećanja šupljine. Molekularno modeliranje je pak pokazalo da kisikovi atomi vezani na C-1 i C-3 atome adamantanskih jedinica imaju smanjenu sposobnost vezanja kationa zbog steričkog smetnji prouzročenih vodikovim atomima metilenske skupine na položaju C-2 adamantana. Metilenska grupa na adamantanskom skeletu smanjuje veličinu šupljine krunastih etera LET-645 i LET-640, čini je manje simetričnom i na tome ometa dobre vezne interakcije svih 5, odnosno 6 kisikovih atoma makrocikliskog prstena s kationom (Mlinarić-Majerski i Kragol 2001).

Heksaciklen trisulfat (LET-646), analog 18-kruna-6 s dušikovim umjesto kisikovim atomima, ima jako inhibicijsko djelovanje na rast stanica, a DB-N2O2-15-K (LET-610) s 2 atomima kisika i 2 atomima dušika kao donorima u prstenu od 15 atoma, te 2 benzo supstituenta pokazuje umjereno inhibicijsko djelovanje. Ovi spojevi sadrže atome dušika kao donore, a prisutnost bazičnih amina, omogućava difuziju protona u makrociklisku šupljinu, te nastali protonirani derivati mogu stupiti u interakciju s anionima (Tusek-Božić i sur. 2005). Miješani dioksa-diaza makrocikliski spoj LET-610 može stvarati komplekse s više kationa i aniona od svojih analoga s isključivo kisikovim ili dušikovim atomima pošto dušik i kisik imaju različita donorska svojstva (Kralj i sur. 2008). Između 2 kisikova atoma je tipična etilenska jedinica, a između ostalih atoma donora su dulje jedinice od 3 člana. Na dvije dulje jedinice između kisikovog i dušikovog atoma spojeni su benzenski prsteni, konformacijski nepokretljivi dijelovi prstena. Pokazano je npr. iako je veličina šupljine makrocikliskog spoja od 15 članova prikladna za vezanje iona natrija, afinitet DB-N2O2-15-kruna (LET-610) u metanolu je puno veći za protone nego za ione natrija, pa dolazi do stvaranja kompleksa protonirane DB-N2O2-kruna-anion (Tusek-Božić i sur. 2005). Razlog tome je što je energija solvatacije Na^+ velika zbog njegove velike gustoće naboja, dušikovi atomi imaju mali afinitet za katione alkalijskih metala, te kisikovi atomi u blizini benzena imaju smanjenu pokretljivost i bazičnost. S druge strane, makrocikliski heksaamin (LET-646) se ponaša kao receptor za metalne katione i anione. Pri neutralnom pH u vodenim otopinama je protoniran i stvara stabilne komplekse s različitim fiziološki važnim anionima (npr. fosfatni, karbonatni ioni) (Kimura i sur. 1982). Međutim, može doći i do zamjene protona u makrociklisku šupljini s jakim Lewisom kiselinom (akceptorom elektronskog para), prvenstveno ionima prijelaznih metala (npr. Zn^{2+}) i takva molekula sad može vezati anione (Kimura i Koike 1998). U antiproliferativnom ispitivanju, prosječna IC_{50} heksaciklen sulfata iznosila je od 2-16 μM ovisno o tumorskoj liniji, a Gad i suradnici (1985) su ga testirali na sisavcima, gdje je djelovao toksično i izazvao neurobihevioralne poremećaje.

Krunasti eter bis(4-heksadecil benzo)-18-K-6 (LET-647) je pokazao slabo protutumorsko djelovanje. Ima 18 lanova u prstenu, na koje su spojeni benzenski prsteni s dugim perifernim alkilnim lancima koji ga čine jako hidrofobnim, što je vjerojatno razlog njegovoj slabo topljivosti u vodenoj otopini i velikim razlikama u rezultatima. Najvjerojatnije, kao i ostali krunasti eteri njegove veličine makrocikli koga prstena, veže ione kalija, a može se pretpostaviti da se s alkilnim lancima ugrađuje u staničnu membranu, budući da se strukturno sliče na lariat eteri, derivati 4,13-diaza-18-K-6 s dovoljno dugim ugljikovodničkim lancima pri vršenju na dušikovim atomima ugrađuju u membranu i ostaju relativno statični, pa ne izazivaju toksičnost (Leevy i sur. 2005b).

Krunasti eter DB-14-K-4 (LET-648) je vrlo slabo inhibirao rast tumorskih stanica. 14-krune-4 su zanimljive jer imaju skoro optimalnu veličinu šupljine za stvaranje kompleksa s ionima litija. Kao i za 18-krune-6, istraživanja su pokazala da otapalo snažno utječe na stvaranje kompleksa ion-supstituirana 14-kruna-4 i da njegova stabilnost ovisi o položaju i vrsti supstituenata (Chen i sur. 1984). Benzenski prsteni kao supstituenti daju rigidnost ovom spoju i preorganiziran je za vezanje metalnih iona, posebice Li^+ (Dalley i sur. 1992). Kisikovi atomi su smješteni u pogodne položaje za vezanje iona, te su konformacije slobodnog i vezanog liganda slične (Chen i sur. 1984). Budući da DB-14-K-4 selektivno veže Li^+ , može se pretpostaviti da prijenos litija kroz membranu i njegov gubitak iz stanice, nema značajan antiproliferacijski utjecaj.

Budući da na antiproliferativnu aktivnost utječu razna molekularna svojstva, Marjanović i suradnici (2007) koristili su tzv. SVM algoritam (engl. *support vector machine*) pomoću kojeg se kompjuterski pokušava modelirati odnos strukture i biološke aktivnosti (QSAR, engl. *quantitative structure-activity relationship*). Rezultati iz ovog diplomskog rada će se iskoristiti za poboljšanje tog modela, a s dugoročnim ciljem to i nog *in silico* predviđanja aktivnosti bilo kojeg krunastog etera, a posebno iz klase spojeva 18-kruna-6.

Ionofor LET-613 se pokazao najaktivnijim ispitanim makrocikličkim spojem na antiproliferativno djelovanje tumorskih stanica u ovom radu, s IC_{50} od 1,7-4 μM , no njegova sinteza, kao niti struktura još nije poznata javnosti te se zbog mogućnosti patentnog zaštite i njezina još ne smije prikazivati. Ipak, željeli smo saznati više o mehanizmu njegovog djelovanja na proliferaciju stanica te taj mehanizam usporediti s prije pokazanim u inkom spoja LET-329 (di-*tert*-butil-dicikloheksano-18-kruna-6). Analizom staničnog ciklusa proto metodom citometrijom utvrdili smo da LET-613 nakon 36 h dovodi do snažnog zaustavljanja stanica raka gušterače MiaPaCa-2 u G1 fazi staničnog ciklusa i velikog smanjenja broja stanica u S fazi što se potpuno slaže s podacima dobivenim za druge ispitanice

krunaste etere (Marjanović i sur. 2007). Nakon 48 h, LET-613 uzrokuje povećanje subG1 populacije stanica, odnosno apoptotskih stanica koje su bile zaustavljene u G1 fazi. Marjanović i suradnici (2007) su također pokazali da krunasti eter LET-329, koji je u antiproliferativnom ispitivanju pokazivao izraziti učinak s IC_{50} u submikromolarnim koncentracijama, izaziva povećanje broja apoptotskih stanica, ali je taj učinak bio znatno veći, što je vjerojatno u skladu sa značajnije nižim IC_{50} vrijednostima. U prijašnjem istraživanju utjecaja ionofora na stanični ciklus, valinomycin je selektivno zaustavio netransformirane stanice glodavaca u G1 fazi staničnog ciklusa, dok se transformirane stanice većinom nisu nakupljale u G1 fazi (Kleuser i sur. 1985). No, nedavno je ustanovljeno da valinomycin također izaziva akumulaciju tumorskih (transformiranih) stanica u G1 fazi, smanjenje broja stanica u S fazi i iznimno povećanje subG1 populacije, odnosno apoptotskih stanica (Marjanović i sur. 2007). Poznato je da je aktivnost kalijevih kanala nužna za staničnu proliferaciju, ali i za apoptozu. Stimulacija mirujućih stanica u G0 fazi faktorima rasta, aktivira K^+ kanale i stanica prolazi kroz G1 fazu, tj. započinje proliferacija (Kunzelmann 2005), premda mehanizam još nije potpuno jasan. Snažno zaustavljanje stanica u G1 fazi nakon 36h i zatim povećanje broja apoptotičnih stanica nakon 48h, izazvano spojem LET-613, potvrđuje važnost prijenosa kalijevih iona tijekom G1 faze staničnog ciklusa i u apoptozi. To se slaže sa zapažanjima da povećani izlaz K^+ dovodi do povećanja broja stanica u G1 fazi, nakon čega slijedi veliki porast apoptotičnih stanica (Wible i sur. 2002).

Budući da se u subG1 populaciji nalaze i stanice koje nisu umrle apoptozom i stanični fragmenti, htjeli smo sa sigurnošću ustanoviti da krunasti eteri LET-613 i LET-329 nakon 48 h izazivaju apoptozu u tumorskim stanicama i to smo dokazali aneksin-V testom. Međutim, postoje značajne razlike u postocima apoptotičnih stanica dobivenih analizom staničnog ciklusa na prototipnom citometru (subG1 populacija) i specifičnom detekcijom aneksina V testom. Npr. čak je 37% stanica raka gušterače MiaPaCa-2 tretiranih spojem LET-329 bilo u subG1 fazi (Marjanović i sur. 2008). Zatim, kad smo više puta pokušali kvantitativno odrediti aktivaciju apoptoze MiaPaCa-2 aneksin V testom nismo mogli dobiti jasne rezultate, što je vjerojatno posljedica specifičnosti stanične linije. Zato smo odlučili koristiti drugu staničnu liniju – stanice karcinoma debelog crijeva SW620, no specifično smo detektirali samo 10% apoptotičnih stanica SW620. S druge strane, samo 10% MiaPaCa-2 stanica tretiranih spojem LET-613 se nalazilo u subG1 fazi, a specifično smo detektirali 23% stanica SW620. Moguće je da su navedene razlike posljedica korištenja različitih tumorskih staničnih linija.

Valinomycin je također aktivirao apoptozu, što se slaže s prijašnjim istraživanjima, gdje se pokazalo da izaziva apoptozu u tumorskim stanicama sisavaca (Allbritton 1988; Duke i sur.

1994; Inai i sur. 1997). Međutim broj stanica u apoptozi bio je izrazito mali, što je vjerojatno posljedica dužeg stajanja spoja u otopini, što je moglo dovesti do raspada spoja pa time i njegove znatno slabije aktivnosti.

Iako je izlazak kalijevih iona potreban za proliferaciju i za apoptozu, što se čini paradoksalnim, bitno je sjetiti se da je tijekom apoptoze aktivacija kalijevih kanala puno izraženija nego tijekom proliferacije (Yu i Choi 2000). Također, izlazak K^+ tijekom apoptoze uvelike nadmašuje onaj u tumorskim stanicama koje proliferiraju (Kunzelmann 2005). Usto, mnogi enzimi bitni za rast i mitozu zahtijevaju minimalnu koncentraciju K^+ , pa je izlazak K^+ smanjiti proliferativnu sposobnost stanice. S druge strane, važno je reći i da niski sadržaj K^+ dopušta aktivaciju enzima uključenih u proces apoptoze (Marklund i sur. 2001). Vjeruje se da su promjene u ionskoj jakosti tijekom izlaska K^+ i Cl^- iona, te ulaska Ca^{2+} iona važne u poticanju apoptoze (Kunzelmann 2005). Valinomycin djeluje kao kalijev ionofor, te na taj način izaziva smanjenje unutarstanične koncentracije K^+ što omogućuje smanjenje staničnog volumena tijekom apoptoze i aktivaciju potrebnih enzima (Marklund i sur. 2001). Naši rezultati upućuju da krunasti spojevi ostvaruju antiproliferativni učinak, te izazivaju apoptozu svojim djelovanjem kao prijenosnici iona preko membrane tumorskih stanica. Njihova aktivnost uvelike ovisi o strukturi – hidrofobnog prstena bitnog za ugradnju u membranu i hidrofilne šupljine koja veže katione.

Rak je jedan od glavnih uzroka smrti u svijetu i često standardne terapije nisu dovoljne za potpuno izlječenje. Tradicionalnom kemoterapijom se oštećuje DNA i izaziva apoptoza uglavnom brzo proliferirajućih stanica, tumorskih i normalnih. Budući da nijedan lijek protiv raka vjerojatno neće biti oslobođen neželjenih popratnih učinaka, vjeruje se da bi krunasti spojevi ili drugi membranski aktivni lijekovi mogli djelovati toksično na drugačiji način od konvencionalnih kemoterapeutika i kao takvi se koristiti u terapiji (Marjanović i sur. 2007). Kalijevi ionofori bi se mogli koristiti u kombinaciji s postojećim lijekovima i tako pružiti značajan doprinos terapiji, ali su potrebna daljnja istraživanja njihove potencijalne kliničke primjene (Marklund i sur. 2001). Narušavanje ionske homeostaze toksično djeluje i na normalno tkivo. Tako je npr. davno istraživanje na životinjama, pokazalo je da je većina kationskih ionofora (valinomycin, heksaciklen trisulfat) uglavnom uzrokovala neurobihevioralne poremećaje, koji su ipak nestali nakon prekida tretmana (Gad i sur. 1985). Stoga bi se trebali razmotriti i novi načini kako bi se smanjili negativni popratni učinci, kao npr. pasivno ciljanje stanica raka, gdje je ionofor zatvoren ili vezan za lipidni ili polimerski nosač te aktivno ciljanje stanica raka, gdje dodani dio (npr. monoklono antitijelo, ligandi:

peptidi, še eri ili lektini) upu uje lijek na pravu stanicu, vežu i se sa specifi nim receptorom na stani noj površini (Marjanovi i sur. 2007).

6. ZAKLJU AK

- makrocikli ki spojevi LET-645, LET-611, LET-640 i LET-648 ne utje u ili jako slabo usporavaju rast tumorskih stanica HeLa, SW620, MCF-7, H460 i MiaPaCa-2 u najve oj ispitanoj koncentraciji 10^{-4} M
- makrocikli ki spoj LET-647 je slabo topljiv u vodenoj otopini i ne može se to no odrediti njegovo antiproliferativno djelovanje, iako je zna ajno
- makrocikli ki spojevi LET-610, LET-612, LET-646 i LET-613 pokazuju citostati ki i/ili citotoksi ni u inak na rast 5 tumorskih stani nih linija
- struktura makrocikli kih spojeva (veli ina hidrofilne šupljine, tip atoma donora i grupe koje prodiru u šupljinu, te hidrofobni prsten) može se povezati s njihovom antiproliferativnom aktivnoš u
- spoj LET-613 je najja e inhibirao rast tumorskih stanica (IC_{50} su $2 \mu M$) te je pri koncentraciji $10 \mu M$ snažno zaustavljao tumorske stanice MiaPaCa-2 u G1 fazi stani nog ciklusa i uzrokovao smanjenje broja stanica u S fazi nakon 36 h inkubacije, dok je nakon 48 h doveo do pove anja postotka stanica u subG1 fazi, odnosno apoptotskih stanica
- dokazali smo da krunasti eteri LET-613 i LET-329 zaista aktiviraju apoptozu, kao što upu uju rezultati proto ne citometrije. Nakon 48 h inkubacije sa LET-613 u koncentraciji $10 \mu M$, detektirano je 23% stanica u apoptozi, a nakon inkubacije s LET-329 koncentracije $1 \mu M$ detektirano je 10% apoptoti nih stanica

7. LITERATURA

- Abdalah R, Wei L, Francis K, Yu SP (2006): Valinomycin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Neurosci Lett* **405**: 68-73.
- Adrain C, Creagh EM, Martin SJ (2001): Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J* **20**: 6627-6636.
- Allbritton NL, Verret CR, Wolley RC, Eisen HN (1988): Calcium ion concentrations and DNA fragmentation in target cell destruction by murine cloned cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **167**: 514-527.
- Arenaz P, Bitticks L, Pannell K, Garcia S (1989): Genotoxic potential of crown ethers in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis* **4**: 437-438.
- Arenaz P, Bitticks L, Pannell KH, Garcia S (1992): Genotoxic potential of crown ethers in mammalian cells: induction of sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* **280**: 109-115.
- Boatright KM, Salvesen GS (2003): Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 725-731.
- Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ (1997): Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surg Oncol* **6**: 133-142.
- Boojar MM, Goodarzi F (2006a): Cytotoxicity and the levels of oxidative stress parameters in WI38 cells following 2 macrocyclic crown ethers treatment. *Clin Chim Acta* **364**: 321-327.
- Boojar MM, Goodarzi F (2006b): Oxidative response of rat lung tissue after crown ethers exposure and the effects of alpha-tocopherol treatment. *Clin Chim Acta* **370**: 158-164.
- Chen CS, Wang SJ, Wu SC (1984): Solvent effects in the complexation of dibenzo-14-crown-4 and its analogs with lithium ion. *Inorganic Chemistry* **23**: 3901-3903.
- Dalley NK, Jiang W, Olsher U (1992): The crystal structure of dibenzo-14-crown-4, a preorganized basis of square pyramid coordination for lithium ions. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **12**: 305-312.

- Daoud SS, Juliano RL (1986): Reduced toxicity and enhanced antitumor effects in mice of the ionophoric drug valinomycin when incorporated in liposomes. *Cancer Res* **46**: 5518-5523.
- Duke RC, Witter RZ, Nash PB, Young JD, Ojcius DM (1994): Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. *Faseb J* **8**: 237-246.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50.
- Gad SC, Reilly C, Siino K, Gavigan FA, Witz G (1985): Thirteen cationic ionophores: their acute toxicity, neurobehavioral and membrane effects. *Drug Chem Toxicol* **8**: 451-468.
- Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA (1996): Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* **12**: 1173-1180.
- Gloe K (2005): *Macrocyclic chemistry: current trends and future perspectives*. Springer, Dordrecht.
- Gokel GW, Leevy WM, Weber ME (2004): Crown ethers: sensors for ions and molecular scaffolds for materials and biological models. *Chem Rev* **104**: 2723-2750.
- Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH (1991): The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **67**: 293-302.
- Green DR (1998): Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* **94**: 695-698.
- <http://dtp.nci.nih.gov/>
- <http://www.who.int/en/>
- Hughes FM, Jr., Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA (1997): Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* **272**: 30567-30576.

- Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S (1999): The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* **398**: 777-785.
- Inai Y, Yabuki M, Kanno T, Akiyama J, Yasuda T, Utsumi K (1997): Valinomycin induces apoptosis of ascites hepatoma cells (AH-130) in relation to mitochondrial membrane potential. *Cell Struct Funct* **22**: 555-563.
- Karki P, Seong C, Kim JE, Hur K, Shin SY, Lee JS, Cho B, Park IS (2007): Intracellular K(+) inhibits apoptosis by suppressing the Apaf-1 apoptosome formation and subsequent downstream pathways but not cytochrome c release. *Cell Death Differ* **14**: 2068-2075.
- Kimura E, Koike T (1998): Dynamic anion recognition by macrocyclic polyamines in neutral pH aqueous solution: development from static anion complexes to an enolate complex. *Chemical Communications* **15**: 1495-1599.
- Kimura E, Sakonaka A, Kodama M (1982): A carbonate receptor model by macromonocyclic polyamines and its physiological implications. *Journal of the American Chemical Society* **104**: 4984-4985.
- Kleuser B, Rieter H, Adam G (1985): Selective effects by valinomycin on cytotoxicity and cell cycle arrest of transformed versus nontransformed rodent fibroblasts in vitro. *Cancer Res* **45**: 3022-3028.
- Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ (1999): How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* **97**: 431-434.
- Kralj M, Tusek-Bozic L, Frkanec L (2008): Biomedical potentials of crown ethers: prospective antitumor agents. *ChemMedChem* **3**: 1478-1492.
- Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E (2002): *Cancer Medicine*. BC Decker Inc, Hamilton.
- Kunzelmann K (2005): Ion channels and cancer. *J Membr Biol* **205**: 159-173.
- Leevy WM, Gammon ST, Levchenko T, Daranciang DD, Murillo O, Torchilin V, Piwnicka-Worms D, Huettner JE, Gokel GW (2005a): Structure-activity relationships, kinetics,

- selectivity, and mechanistic studies of synthetic hydrophile channels in bacterial and mammalian cells. *Org Biomol Chem* **3**: 3544-3550.
- Leevy WM, Weber ME, Gokel MR, Hughes-Strange GB, Daranciang DD, Ferdani R, Gokel GW (2005b): Correlation of bilayer membrane cation transport and biological activity in alkyl-substituted lariat ethers. *Org Biomol Chem* **3**: 1647-1652.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.
- Marjanovic M, Kralj M, Supek F, Frkanec L, Piantanida I, Smuc T, Tusek-Bozic L (2007): Antitumor potential of crown ethers: structure-activity relationships, cell cycle disturbances, and cell death studies of a series of ionophores. *J Med Chem* **50**: 1007-1018.
- Marklund L, Henriksson R, Grankvist K (2001): Cisplatin-induced apoptosis of mesothelioma cells is affected by potassium ion flux modulator amphotericin B and bumetanide. *Int J Cancer* **93**: 577-583.
- Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ (1992): Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* **71**: 323-334.
- Meulmeester E, Jochemsen AG (2008): p53: a guide to apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* **8**: 87-97.
- Mirkhodjaev UZ, Boldyrev VA, Yarishkin OV, Tashmukhamedov BA (2005): On the Mechanism of Action of Dibenzo-18-crown-6 Diacyl-Derivatives on Malignant Tumors. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **53**: 191-196.
- Mlinaric-Majerski K, Kragol G (2001): Design, synthesis and cation-binding properties of novel adamantane- and 2-oxaadamantane-containing crown ethers. *Tetrahedron* **57**: 449-457.

- Mlinaric-Majerski K, Visnjevac A, Kragol G, Kojic-Prodic B (2000): Molecular structure of bis[(1,3)2-oxaadamantano]-18-crown-6 and its potassium picrate complex. *Journal of Molecular Structure* **554**: 279-287.
- Nakanishi M, Robetorye RS, Adami GR, Pereira-Smith OM, Smith JR (1995): Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. *EMBO J* **14**: 555-563.
- Naumowicz M, Petelska AD, Figaszewski ZA (2003): The effect of the presence of crown ether on ion transport across the lipid bilayer. *Cell Mol Biol Lett* **8**: 383-389.
- Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L (1997): Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol* **173**: 233-236.
- Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M (1995): Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* **15**: 2612-2624.
- Ouchi M, Inoue Y, Kanzaki T, Hakushi T (1984): Molecular design of crown ethers. 1. Effects of methylene chain length: 15- to 17-crown-5 and 18- to 22-crown-6. *Journal of Organic Chemistry* **49**: 1408-1412.
- Ponder BA (2001): Cancer genetics. *Nature* **411**: 336-341.
- Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH (2001): Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 332-337.
- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E (1998): DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**: 2831-2841.
- Schneider HJ, Yatsimirsky AK (2008): Selectivity in supramolecular host-guest complexes. *Chem Soc Rev* **37**: 263-277.
- Sherr CJ (1993): Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**: 1059-1065.

- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996): Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* **184**: 1331-1341.
- Tso W-W, Fung W-P, Tso M-YW (1981): Variability of crown ether toxicity. *J Inorg Biochem* **14**: 237-244.
- Tusek-Bozic L, Visnjevac A, Marotta E, Kojic-Prodic B (2005): The inside and outside protonation of a 15-membered O₂N₂-macrocyclic. Synthesis and structural characterization of the protonated ligand salts. *Polyhedron* **24**: 97-111.
- Wakefield LM, Roberts AB (2002): TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 22-29.
- Wible BA, Wang L, Kuryshev YA, Basu A, Halder S, Brown AM (2002): Increased K⁺ efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3beta in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **277**: 17852-17862.
- Wonderlin WF, Strobl JS (1996): Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol* **154**: 91-107.
- Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, Harlow E, Lees JA (1995): In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* **15**: 2536-2546.
- Yu SP, Choi DW (2000): Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9360-9362.
- Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL, Choi DW (1997): Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* **278**: 114-117.
- Zimmermann KC, Green DR (2001): How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* **108**: S99-103.